

TÍTULO DE PATENTE NO. 336558

Titular(es): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
Domicilio: Instituto Literario Núm. 100, Colonia Centro, 50000, Toluca, Estado de México, MÉXICO
Denominación: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ANTIPARASITARIA DE EXTRACTO DE HOJAS DE salix babylonica y Leucaena Leucocephala PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PARASITARIAS EN EL GANADO OVINO
Clasificación: Int.CI.8: A61K31/00; A61K36/00
Inventor(es): ABDEL-FATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM



Número:
MX/a/2012/001637

País:

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 8 de febrero de 2032



La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial. De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años imprescriptibles, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y esta sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/02/1994, reformada el 02/06/1994, 25/06/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 26/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 10/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 25 de enero de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ANTIPARASITARIA DE EXTRACTO DE HOJAS DE*****Salix babylonica* y *Leucaena leucocephala* PARA EL TRATAMIENTO DE****ENFERMEDADES PARASITARIAS EN EL GANADO OVINO****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende antiparasitaria de un extracto de dos especies vegetales de *Salix babylonica* y *Leucaena leucocephala* y sus combinaciones de 1:1 así como al método para obtención de dichos extractos y sus fracciones de los compuestos químicos. Se utilizó el GC-MS (cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas) para la identificación de los compuestos químicos en los extractos. Los compuestos químicos identificados en *S. babylonica*, *L. leucocephala* y sus combinaciones (1:1) fueron 9, 15 y 20 compuestos, respectivamente. Dicha formulación se utiliza para el tratamiento, cura y prevención de las enfermedades parasitarias intestinales en el ganado ovino. Esta formulación de la presente invención, brinda una solución para el tratamiento de la enfermedad parasitaria en el ganado ovino; ya que dicha formulación comprende un extracto con una mayor concentración de compuestos activos que producen un mayor efecto antihelmíntico en estos animales. Las fracciones de los extractos vegetales presentan propiedades antihelmínticas y son obtenidos por un método breve y con volumen de elusión estandarizados que optimizan los rendimientos utilizando el GC-MS. Adicionalmente, los extractos y sus fracciones, no presentaron efectos tóxicos en fase líquida, lo que representa una ventaja sobre los fármacos y otros extractos vegetales. Dichas presentaciones farmacéuticas de los extractos comprenden orales a los borregos y, las cuales pueden ser elaborados con técnicas convencionales de manufactura farmacéutica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades parasitarias se encuentran entre las causas más frecuentes e importantes que ocasionan una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios de todo el mundo. Tales problemas disminuyen sutil o apreciablemente la producción de los animales trayendo como consecuencia bajas utilidades a los productores, lo cual favorece el desaliento y abandono de la actividad pecuaria (Cuéllar, O.J.A., Chávez, H.A., Fernández, M.S., Silva, M.R., Miranda, M.S. "Evaluación de dos sistemas de manejo para el control de



nematodos gastroentéricos de corderos en el trópico sub-húmedo mexicano (L2004 Mem. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). La Habana, Cuba). Los sistemas de producción de pequeños rumiantes basados fundamentalmente en la utilización de forrajes encuentran en estas parasitosis una de las limitantes más importantes para el aprovechamiento eficiente de este recurso nutricional, con efectos sobre las ganancias de peso, desarrollo corporal y el comportamiento reproductivo, e indirectos como la subutilización del recurso forrajero, la predisposición a enfermedades y las complicaciones en el manejo, entre otras. Dentro de las enfermedades parasitarias las nematodosis gastrointestinales, en especial, es una enfermedad multietiológica ocasionada por la acción conjunta de varios géneros y especies de parásitos, y puede considerarse como un complejo parasitario, el cual afecta por igual a ovinos y caprinos. (P.E. Steffan. "Control de los nemátodos internos de los bovinos mediante el uso racional de antihelmínticos". Conferencia Electrónica. Red Latinoamericana de Helmintología. INTA-FAO. Argentina, 2000).

Los géneros más importantes son: *Haemonchus*, *Mecistocirrus*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus*, en el abomaso; *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, *Bunostomum* y *Strongyloides*, en el intestino delgado, y *Oesophagostomum*, *Chabertia*, *Trichuris* y *Agriostomum*, en el intestino grueso (Benavides, 1996; Villar, 1997). De estos nematodos, los géneros *Haemonchus*, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* y *Oesophagostomum* son considerados como los más importantes desde el punto de vista patológico y epidemiológico, en los rumiantes por encontrarse distribuidos en las más diversas zonas geocológicas del planeta, y son producidos por una amplia gama de especies, las cuales pueden variar según las regiones (C. García-Romero, F. Valcárcel-Sancho, M. Cordero del Campillo, F.A. Rojo-Vázquez. "Etiología y epizootiología de las infestaciones por tricostrongílidos en bovinos en Galicia". Med. Vet. 1994; 11 (3):212-218).

Durante muchos años se han propuesto diversas formas de control y prevención de estas nematodosis, entre las que se encuentran los métodos de manejo de pastizales y el pastoreo alternativo y mixto entre diferentes especies (G. Aumont. "Integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants in the humid tropics". Conferencia. Curso "Ruminant production at grazing in the humid tropics". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba, 1998), la selección genética de animales resistentes al parasitismo, con una mayor utilización de las razas autóctonas, la utilización de vacunas y los controles biológicos (P. Mendoza de Gives. "Control biológico o de nematodos parásitos de rumiantes utilizando enemigos naturales". En: Memorias, 2do. Curso Internacional "Epidemiología y control Integrado de nemátodos gastrointestinales de importancia económica en pequeños rumiantes". Eds. F.J., Torres &



- A.J., Aguilar. Yucatán, México. 2002; p. 82-86; P.J. Waller. "Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control". *Animal Health Research Reviews*. 2003; 4(1): 35-43).
- 5 Dentro de estas nuevas estrategias de control parasitarias, se han comenzado a evaluar las potencialidades de algunas sustancias presentes en los forrajes, denominadas como factores antinutricionales, las cuales, según los investigadores constituyen una excelente alternativa para disminuir la carga parasitaria en pequeños rumiantes, parece ser una realidad a corto plazo, ofreciendo una alternativa eficiente y segura en la reducción de la
- 10 población parasitaria.
- La alta incidencia de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes, especialmente *Haemonchus contortus* y en menor escala otros, como *Cooperia* spp, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum* spp y *Strongyloides papillosus*, y la resistencia que los mismos han generado a gran parte de los fármacos antiparasitarios, hacen necesaria la
- 15 búsqueda de nuevas soluciones a este problema (L.I. Alvarez, M. L. Mottier, C.E. Lanusse. "Drug transfer into target helminth parasites". *RENDS in Parasitology*. 2007; 23: 97-104). Existe evidencia que algunos factores antinutricionales tales como los taninos presentes en las leguminosas en niveles medios contribuyen al control de parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes, lo cual se traduce en un mejor desempeño productivo (V. Paolini, J.P.
- 20 Bergeaud, C. Grisez, F. Prevot, Ph. Dorchies, H. Hoste. "Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*". *Veterinary Parasitology*. 2003; 113:253).
- La utilización de agentes biológicos como los extractos arbustivos destinados a reducir estados larvarios en rumiantes ha crecido considerablemente en los últimos 5 años, debido
- 25 al impacto obtenido. La investigación sobre la utilización de extractos de plantas en la alimentación animal es reciente; específicamente en el efecto que tienen algunos componentes de hojas de arbustos utilizados como forraje no se ha hecho prácticamente nada; lo más semejante es un estudio que se realizó en Venezuela en corderos de razas tropicales (R. Medina, A. Sánchez. "Efecto de la suplementacion con follaje de *L. leucocephala* sobre la ganancia de peso de ovinos desparasitados y no desparasitados
- 30 contra estromgilidos digestivos". *Zootecnia Tropical*, 2006; 24(1): 55-68), donde alimentándolos con hojas de *L. leucocephala* se midió el comportamiento productivo en términos de ganancia de peso en dos grupos, uno desparasitado contra estromgilidos y el



otro sin desparasitar; el resultado fue que el grupo sin desparasitar y consumiéndose *leucocephala* ganó más peso con respecto al otro que no consumió *L. leucocephala*.

Se ha reportado que los animales que recibieron hojas de *L. leucocephala* como suplemento alimentario, mantuvieron cargas parasitarias menores de 500 huevos/g, en comparación con cargas progresivas de 800, 1000, 2.000 y 4.000 huevos/g en animales suplementados con pasto Guinea y *Brachiaria* en el mismo lapso de cinco meses de duración del ensayo (T.R. Preston. 2004. "Estrategia nutricional de la cabra". *Memorias II Seminario Binacional Caprino*. San José de Cúcuta. Colombia. 2004). Además se reportó que las plantas arbustivas con niveles bajos de taninos condensados disminuyen las infestaciones parasitarias en los rumiantes, además contribuyen a mejorar el plano nutricional por su rol en la protección de la proteína pasante a nivel de la degradación ruminal (P.J. Waller. "International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock". *International Journal for Parasitology*, 29 (1999); 155164). En investigaciones realizadas en Nueva Zelandia en la década de los 90, con ovinos, en condiciones de ramoneo vs pastoreo, en sistemas con plantas que presentaban taninos condensados, se alcanzó una disminución significativa del parasitismo gastrointestinal en los animales (H. Hoste. Importancia del Oxido de cobre, plantas taníferas y taninos condensados en el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. En: *Memorias, 2do. Curso Internacional "Epidemiología y control Integrado de nemátodos gastrointestinales de importancia económica en pequeños rumiantes"*. Eds. F.J., Torres & A.J., Aguilar. Yucatán, México. 2002; p. 72-76). En cabras en pastoreos, han sido reportados donde se ha observado un decrecimiento significativo del conteo fecal de huevo y la reducción de las afectaciones a nivel de la mucosa gastrointestinal, causadas por el género *Haemonchus* (J. D. Kabasa, J. Opuda-Asibo, U. ter Meulen. "The effect of oral administration of polyethylene glycol on faecal helminth egg counts in pregnant goats grazed on browse containing condensed tannins". *Tropical Animal Health and Production*. 2000; 32: 73; V. Paolini, J.P. Bergeaud, C. Grisez, F. Prevot, Ph. Dorchies, H. Hoste. "Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*". *Veterinary Parasitology*. 2003; 113: 253).

30 La fitomedicina es una actividad humana milenaria, desde hace mucho tiempo algunos productores marginados, muchas veces indígenas, han identificado plantas que mejoran la condición y estado de salud de sus animales (Alejandre, O.M.E., López, V.L., Hernández, F.A. "Plantas de uso medicinal en ovinos en dos comunidades de Oaxaca". *Mem. XIII Congreso Nacional*



de *Producción Ovina (AMTEO)*. 2006, Toluca, México). Cabe mencionar que los principios activos actuales se han aislado o purificado de las plantas. No obstante lo anterior, se crea la necesidad de generar trabajos científicos para validar la dosis, su acción y efectos adversos de los compuestos elaborados a partir de plantas sobre los animales. La mayoría de los datos disponibles se refieren a trabajos *in vitro*, faltando conocer la biodisponibilidad en animales parasitados. En general, los trabajos *in vivo*, los compuestos vegetales han mostrado una baja eficacia y difícilmente igualan a los antihelmínticos sintéticos disponibles (Githiori, J.B., Thamsborg, S.M., Athanasiadou, S. "Use of plants in novel approaches to control of gastrointestinal nematodes in small ruminants". Proc. Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México).

Trabajando específicamente con plantas taníferas (que poseen en su composición taninos condensados), se evaluaron los extractos que de cuatro plantas (*Sarathammus scoparius*, genista; *Calluna vulgaris*, brezo; *Pinus sylvestris*, hojas de pino; *Castanea sativa*, frutas de castaña) que poseen polifenoles y taninos condensados, encontraron que los extractos de pino, castaña y heather tenían un efecto (90%) sobre el desenvainamiento de L-3 de *H. contortus*, en el caso de la genista sólo se pudo retrasar, pero no suspender, el proceso de desenvainamiento larval (Chauveau, S., Martinez, O.C., Frevot, F., Torres, A.F.J. "Effects of extracts from 4 tanniferous plants on the *in vitro* exsheathment of third stage larvae of parasitic nematodes". Proc. Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México).

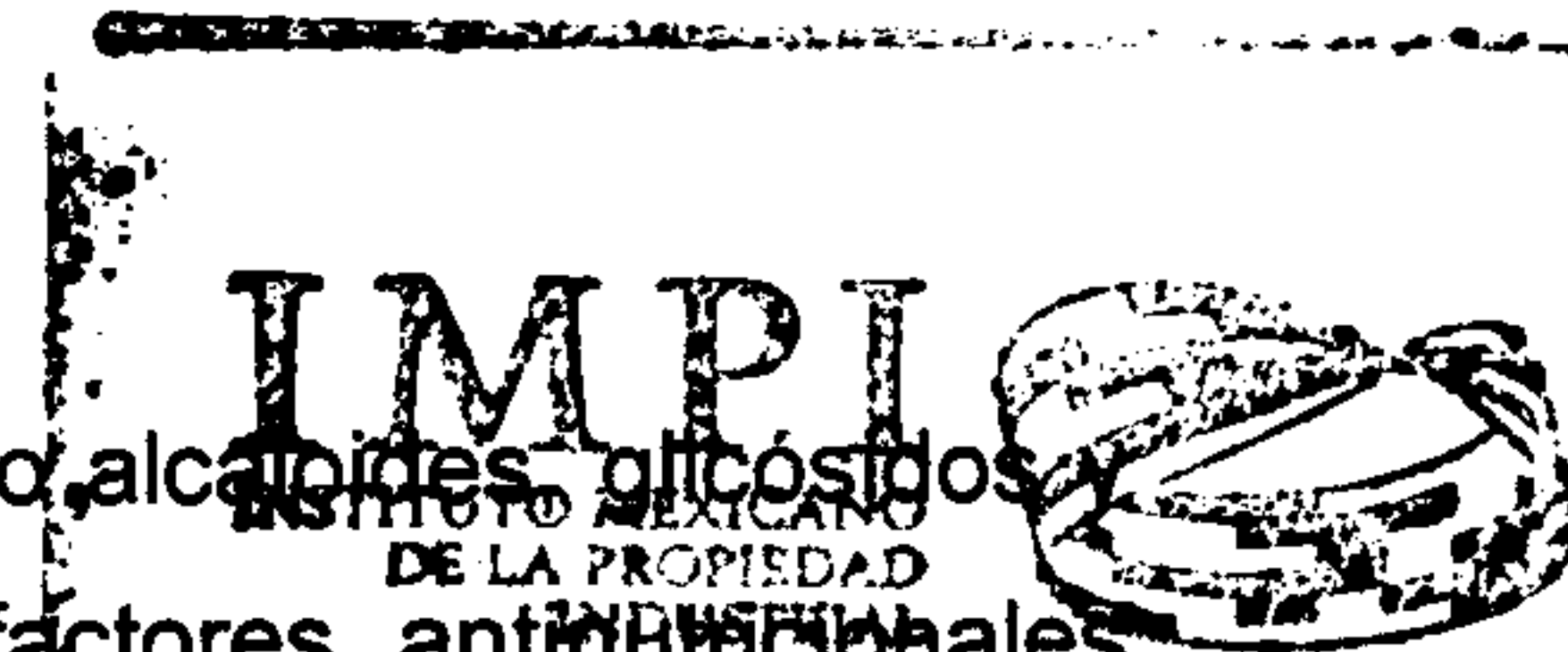
Una evaluación interesante la efectuaron en corderos con una infección artificial con nematodos gastroentéricos a quienes le ofrecieron un forraje (*Sericea lespedeza*) que contiene taninos condensados. Encontraron una buena reducción (>75%) en la eliminación de huevos, sin embargo, sólo durante el periodo de administración del forraje (21 días), después hubo una elevación en la eliminación de huevos. Ellos concluyen que este tipo de forraje solo tiene un efecto sobre la fertilidad de los NGE (Lange, K.C., Ocott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M. "Effect of the condensed tannin containing forage, sericea lespedeza, fed as hay, on natural and experimental challenge infection in lambs". Proc. Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México).



En México, (Hernández, H.A., López, M.N. "Efecto del tratamiento con extractos de plantas medicinales (estafiate, epazote, semilla de calabaza, semilla de papaya y ajo) sobre parásitos gastroentéricos en ovinos". Tesis de licenciatura. 2000, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México) evaluaron el efecto de extractos de plantas medicinales (estafiate, epazote, semilla de calabaza, semilla de papaya y ajo) para el tratamiento de nematodos gastroentéricos en ovinos en pastoreo, encontrando una acción antiparasitaria muy variable y con eficacias de moderadas a bajas. Por su parte (Hounzangbe, A.M.S., Zinsou, E., Hounpke, V., Moutairrou, K., Hoste, H. "Anthelmintic effects of three plants from South Benin on infections of the gastrointestinal tract of sheep with parasitic nematodes". Proc. Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México.), evaluando diferentes esquemas de aplicación de tres plantas (*Zanthoxylum zanthoxyloides*, fagara; *Newbouldia lavis*; *Carica papaya*, semillas de papaya) en ovejas infectadas con NGE, encontraron una reducción importante en la eliminación de huevos, siendo del 87% para las que recibieron fagara y de 95% las tratadas con *Newbouldia*.

Sin embargo, la aplicación de extractos de quebrachos (*Acacia mearnsii*) a corderos infestados con *Trichostrongylus colubriformis* causó la reducción de más del 50% de la excreción de huevos (Athanasiadou S, I Kyriazakis, F Jackson, RL Coop. "Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasited with *Trichostrongylus colubriformis*". *Int J Parasitol*, 2000, 30; 1025-1033 ; Athanasiadou S, I Kyriazakis, F Jackson, RL Coop. "Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies". *Vet Parasitol.*, 2001; 99, 205-219). En Tanzania (R.A. Max, D. Wakelin, P.J. Buttery, A.E. Kimambo, A.A. Kassuku, L.A. Mtenga. "Potential of controlling intestinal parasitic infections in small ruminants (sheep and goats) with extracts of plants high in tannins". Memorias. Taller "Responding to the Increasing Global Demand for Animal Products". 2002; Page 91, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida. México), al utilizar este mismo extracto de quebracho en ovinos infestados con *Haemonchus contortus*, lo que demuestra la actividad antihelmíntica de estos metabolitos secundarios sobre el parasitismo gastrointestinal. La ingestión de taninos condensados de quebracho (50-60 g/kg) podría ser una alternativa a la utilización de fármacos antihelmínticos, debido a su capacidad para reducir el número de huevos fecales y controlar el grado de parasitismo de los animales en larva 1.

Son escasos los trabajos donde se ha logrado caracterizar químicamente los principios activos de las plantas que tienen actividad terapéutica, sin embargo, se han identificado



enzimas (proteínasa de la cisteína) y metabolitos secundarios como alcaloides, glicósidos y taninos. En algunos de esos compuestos se han encontrado factores antimicrobianos

(Githiori, J.B., Thamsborg, S.M., Athanasiadou, S. "Use de plants in novel approaches to control of gastrointestinal nematodes in small ruminants". Proc. Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México).

Dentro la medicina tradicional en Queensland, Australia (F.C. Moreno, I.J. Gordon, A.D. Wright, M.A. Benvenuti, C.A. Saumell. "Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes". Arch. Med. Vet. 2010; 42, 55-163), se estudiaron la capacidad antihelmíntica de algunas especies de plantas y se evaluaron el efecto *in vitro* de extractos de hojas de plantas en la migración de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus placei*, *Cooperia sp*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Los extractos de plantas redujeron la migración de larvas de *H. placei* y *Cooperia sp*. Las plantas con mayor actividad antihelmíntica contra estas especies de nematodos fueron *Allocasuarina torulosa*, *Neolitsea dealbata*, *Acacia holosericea*, *Acacia salicina*, *Callitris endlicheri* y *Casuarina cunninghamiana*. Los extractos fueron menos efectivos en inhibir la migración de larvas de *H. contortus* y *T. colubriformis*. Las plantas que mostraron una mayor inhibición de la migración larval contra estas especies de nematodos fueron *Callitris endlicheri*, *Casuarina cunninghamiana*, *Acacia farnesiana*, *Acacia holosericea* y *Acacia nilotica*. *Callitris endlicheri* fue la especie que más consistentemente inhibió la migración de todas las especies de nematodos estudiadas. Estos resultados *in vitro* sugieren la existencia de propiedades antihelmínticas asociadas con algunas de las especies de plantas evaluadas.

En contraste, a diferencia de la presente solicitud, se utilizaron los extractos de hojas arbustivas, además se monitorearon las poblaciones parasitarias durante un periodo de 60 días en ovinos; resultando disminuida y estadísticamente diferente la población de estrogiloides y otras 8 especies parasitarias en corderos de pelo que consumieron extractos de hojas de *S. babylonica* y *L. leucocephala* así como sus combinaciones (1:1), con respecto a los que no las consumieron; el mismo resultado se encontró en el comportamiento productivo.

Así, en ninguno de dichos estudios o en la búsqueda de antecedentes tecnológicos solicitada ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial se hace referencia a los posibles compuestos químicos (Tablas 1, 2 y 3) de los extractos y fracciones que son herramientas valiosas en el establecimiento de la efectividad y control de calidad de los



fitomedicamentos. De esta manera, en la presente invención, los extractos y sus fracciones de *S. babylonica* y *L. leucocephala* surgen como un producto que presenta ventajas sobre los ya existentes en el estado de la técnica, debido a su utilización en el tratamiento de enfermedad parasitaria sin efectos tóxicos en una administración oral a los ovinos.

- 5 Adicionalmente, la presente invención también se refiere a la preparación de una composición farmacéutica que comprende dichos extractos, o bien las fracciones de *S. babylonica* y *L. leucocephala* con actividad desparasitaria en un tiempo breve en relación con los fraccionamientos habituales de laboratorio donde se utiliza el GC-MS (cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas, equipo Saturno 2100T marca Varian,
- 10 con una columna de gas de acarreo de helio, 1 ml/min. Volumen de inyección 1 μ L) y, aun más un método de elusión que permite optimizar los rendimientos de dichas fracciones. Los extractos, objeto en la presente invención, se encuentran estandarizados en sus contenidos del principio y adicionalmente son obtenidos mediante una mezcla de disolventes orgánicos de baja polaridad (acetona, metanol y hexano en una proporción igual). Los extractos de *S.*
- 15 *babylonica* y *L. leucocephala* objetos de la presente invención, son extractos líquidos que se preparan de ese manera para obtener una apariencia aceptada para los animales.
- No obstante, como ventajas de la presente invención, se refiere una composición farmacéutica elaborada a partir de unos extractos líquidos que involucran un medicamento herbolario, y por lo tanto, son medicamentos de naturaleza completamente distinta. Aún
- 20 más, en el aspecto económico, la composición farmacéutica elaborada a base de compuestos puros presenta otra ventaja, dado que involucra un proceso de purificación exhaustiva

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 En la **Figura 1** se observa el perfil cromatográfico del extracto de *S. babylonica* objeto de la invención. Se muestran los tiempos de retención así como el área bajo cada curva de los compuestos presentes.

- En la **Figura 2** se observa el perfil cromatográfico del extracto de *L. leucocephala* objeto de la invención. Se muestran los tiempos de retención así como el área bajo cada
- 30 curva de los compuestos presentes.

En la **Figura 3** se observa el perfil cromatográfico del extracto de la combinación (1:1) de *S. babylonica* y *L. leucocephala* objeto de la invención. Se muestran los tiempos de retención así como el área bajo cada curva de los compuestos presentes.



En la **Figura 4** se observan los espectros de masas (MS) del tritetracontano en el extracto de *S. babylonica*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto en la figura. Se muestra los tiempos de retención de este compuesto en la figura.

En la **Figura 5** se observa los espectros de masas (MS) del ácido hexadecanoico, metil-ester (ácido palmítico, metil ester) en el extracto de *S. babylonica*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto en la figura.

En la **Figura 6** se observan los espectros de masas (MS) del ácido octadecanoico en el extracto de *S. babylonica*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 7** se observna los espectros de masas (MS) del 1,3-dioxano, 4-(hexadeciloxi)-2-pentadecil en el extracto de *S. babylonica*

En la **Figura 8** se observan los espectros de masas (MS) del Fitol (3, 7, 11, 15-tetrametil-2-hexadecuen-1-ol) en el extracto de *S. babylonica*.

En la **Figura 9** se observan los espectros de masas (MS) del (H)-Benzofuranona 5, 6, 7, 7a-tetrahidro-4, 4, 7 a-trimetil (dihidroactinidiolida) en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 10** se observan los espectros de masas (MS) del ácido pentadecanoico en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 11** se observan los espectros de masas (MS) del 6, 10, 14-trimetil 2-pentadecanona en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 12** se observan los espectros de masas (MS) del dietil-ftalato (ácido 1, 2-Benzen-dicarboxilico) en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 13** se observan los espectros de masas (MS) del 3, 7, 11, 15-tetrametil-2-hexadecuen-1-ol (Fitol) en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 14** se observan los espectros de masas (MS) del 1-nonadecanol en el extracto de *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 15** se observan los espectros de masas (MS) del ácido 9, 12-octadecadienoico- metil ester como compuesto identificado en la mezcla de los extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 16** se observan los espectros de masas (MS) del ácido 9, 12, 15-Octadecatrienoico- etil ester (Z,Z,Z) como compuesto identificado en la mezcla de los



extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

En la **Figura 17** se observa la estructura química del ácido hexacontanoico como compuesto identificado en la mezcla de los extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*.

5 En la **Figura 18** se observan los espectros de masas (MS) del ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico-etil ester, (Z,Z,Z), como compuesto identificado en la mezcla de los extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

10 En la **Figura 19** se observa la estructura química del ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico, metil ester como compuesto identificado en la mezcla de los extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*.

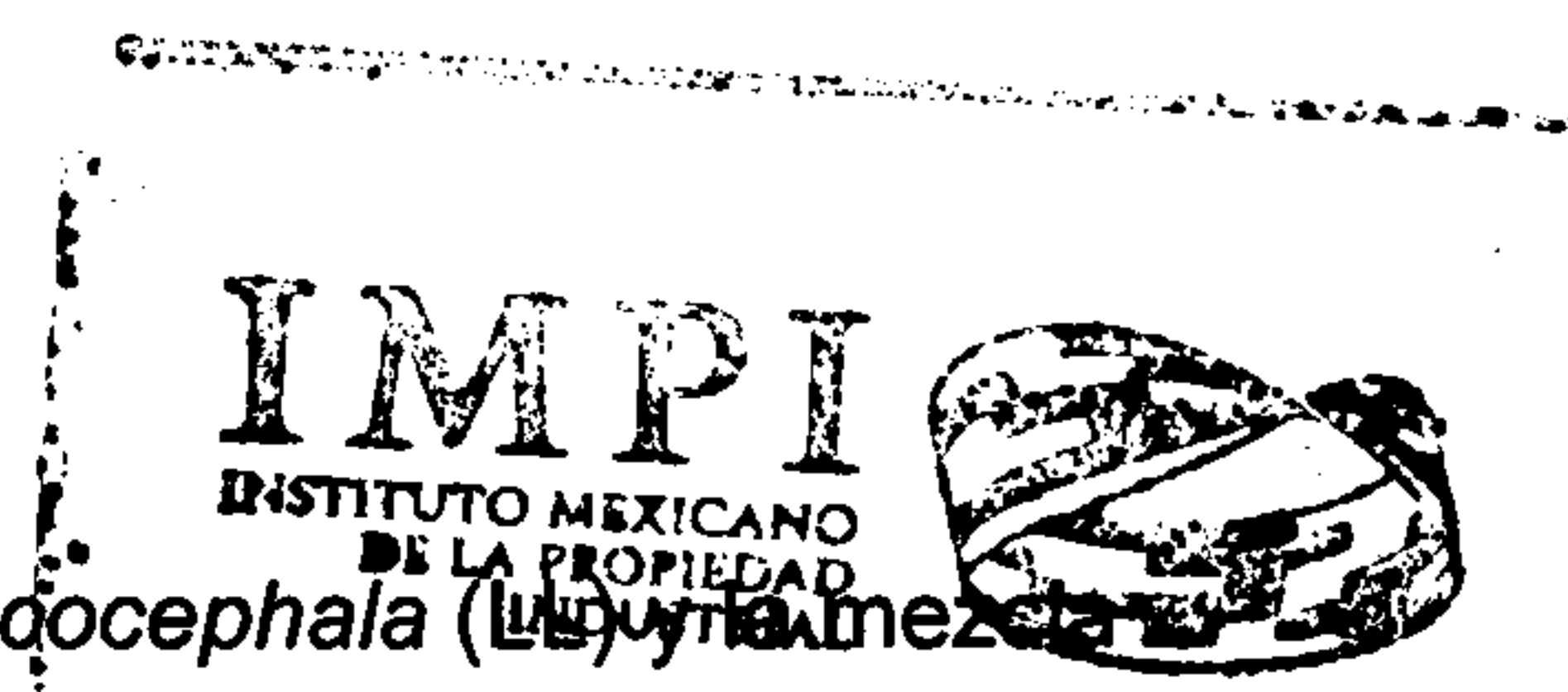
En la **Figura 20** se observan los espectros de masas (MS) del ácido octadecanoico 16-dimetil ester como compuesto identificado en la mezcla de los extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala*. Se muestran los tiempos de retención de este compuesto.

15 En la **Figura 21** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Haemonchus* sp después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

20 En la **Figura 22** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Ostertagia* sp después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratameintos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/ día de extractos.

25 En la **Figura 23** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Oesophagostomum* spp después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratameintos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

30 En la **Figura 24** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Cooperia* sp después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de



la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

5 En la **Figura 25** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Bonostomum* sp después 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

10 En la **Figura 26** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Nematodirus battus* después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especies de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/ día de extractos.

15 En la **Figura 27** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Chaberita* sp después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratameintos de extractos (SB, LL o SBLL), con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

20 En la **Figura 28** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Strongiloides papillosus* después de 20 días (P1), 40 díaa (P2) y 60 días (P3) de la adminstración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especie de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

25 En la **Figura 29** se muestra la estimación de la porcentaje de reducción en el conteo de parásitos (PRCP) de *Nematodirus spathiger*, después de 20 días (P1), 40 días (P2) y 60 días (P3) de la administración oral de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v), en comparación con el grupo control (0 extracto) en ovinos. Se muestra la PRCP de esta especies de parásitos con los tratamientos de extractos (SB, LL o SBLL) con la dosis de 30 ml/animal/día de extractos.

30



En la **Figura 30** se muestra el impacto positivo de los extractos de *S. babylonica* (SB), *L. leucocephala* (LL) y la mezcla de los dos extractos (SBLL, 1:1, v/v) en comparación con el grupo de control (0 extracto) sobre la estimación de la reducción de la carga parasitaria (valores promedio, %) en ovinos.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los detalles característicos de esta formulación farmacéutica indicada para el tratamiento de la enfermedad parasitaria en ovinos, se muestran en la siguiente descripción y en los ejemplos que se acompañan, así como la preparación de los extractos de la especie vegetal utilizada, en la forma farmacéutica de dosificación, siguiendo los mismos signos de referencia para indicar los procedimientos y los ejemplos mostrados.

La forma farmacéutica acorde con la formulación farmacéutica objeto de la presente invención, está particularmente disponible para administración oral. Las formas de dosificación acorde a la formulación farmacéutica objeto de la presente invención, pueden ser elaboradas con técnicas y métodos de fabricación convencionales, entre las que podemos mencionar.

La colecta de las hojas de *S. babylonica* y *L. leucocephala* puede llevarse a cabo entre los meses de agosto y septiembre. Una vez que la planta haya presentado al menos un ciclo de floración y fructificación. Las hojas colectadas se secan en oscuridad a una temperatura de 28°C a 35°C, manteniendo una humedad relativa de 15% a 20%, con un tiempo de secado entre 10 a 15 días. Los materiales vegetales secos se cubren con 8 litros por cada kg de material vegetal con disolvente orgánico de (etanol, metanol y agua), a una temperatura entre 25°C a 30°C para ser reposado durante 72 horas. El disolvente se recupera manualmente en baño maría en un intervalo de 35°C a 40°C para una hora y posteriormente se filtró y se guardó el extracto en refrigeración a una temperatura de 3°C a 4°C hasta que se utilizó oral para el tratamiento de los corderos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden los extractos de *S. babylonica*, *L. leucocephala* o la mezcla de los dos (1:1) con actividades antiparasitarias y está particularmente disponible para administración oral de 30 ml de extracto/animal/día. Se utilizaron 16 corderos, en 4 tratamientos con 4 corderos por tratamiento, en 3 periodos experimentales con una duración de 20 días por tratamiento, dando un total de 60 días del tratamiento con los extractos.

En los siguientes ejemplos se presenta el proceso de obtención del material vegetal, preparación del extracto, fracciones de *S. babylonica*, *L. leucocephala* o la mezcla de los dos

(1:1) empleados en las composiciones farmacéuticas y evaluación de los extractos sobre la carga parasitaria en los corderos.

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
INDUSTRIAL



EJEMPLO No. 1

5 Obtención de los materiales vegetales de *Salix babylonica* y *Leucaena leucocephala*

El material vegetal referido en esta invención se obtuvo a partir de las hojas de *S. babylonica* y *L. leucocephala*, la mayoría recolectadas en la zona sur del Estado de México y parte norte del Estado de México (Toluca), las cuales no recibieron ninguna fertilización en la temporada de la recolección (de noviembre 2009 hasta enero 2010). Posteriormente se secaron en la sombra a una temperatura de 25°C a 30°C en oscuridad, manteniendo una humedad relativa de 15% a 20%, el tiempo de secados es de 15 o 20 días en un área ventilada y se voltearon constantemente para evitar pudrición. Posteriormente se molieron con molino de martillos alcanzando un tamaño de partícula de 0.3 o 0.5 cm y se envasaron en costales de plástico con su identificación correspondiente hasta el momento de elaboración el extracto.

EJEMPLO No. 2

Preparación de los extractos líquidos de *Salix babylonica*, *Leucaena leucocephala*

20 La preparación del extracto líquido de *S. babylonica* y *L. leucocephala*, objeto de la invención, comprende las etapas:

- a) - Secado del material vegetal.
- b) - Molienda.
- c) - Desorción y evaporación de disolventes hasta tener el producto líquido.

25

A continuación se describe cada una de las etapas del método de preparación

a) - Secado del material vegetal

30 Las hojas de *S. babylonica* y *L. leucocephala*, secan en oscuridad a una temperatura de 20°C a 35°C, manteniendo una humedad relativa de 15% a 20%, el tiempo de secados es de 15 o 20 días en una área ventilada.

b)- Molienda

El material vegetal de *S. babylonica* y *L. leucocephala* se tritura en un molino de martillos alcanzando un tamaño de partícula de 0.3-0.5 cm.



- c) - Desorción y evaporación de disolventes hasta tener el producto líquido
- i. en un tanque de plástico (garrafón) de 20 litros se introducen de 2 a 3 kg de material vegetal triturado de *S. babylonica* y *L. leucocephala* (tamaño de particular malla 0.3 a 0.5 cm), y se cubre el material vegetal con 7 a 8 litros por cada kg de material vegetal, preferentemente 7.5 litros por kg con una mezcla de disolventes etanol: metanol: agua destilada en una proporción que va de 100 a 40% de etanol: 40% de metanol: 20% de agua destilada, a una temperatura entre 20°C y 35°C, preferentemente 30°C por 72 horas.
 - ii. Después del reposo 30°C por 72 horas, la mezcla del extracto con disolventes se calentó a baño maría a una temperatura de 30° a 35°C durante un 1h para facilitar la filtración, y se filtró con 4-5 etapas de gasas. La mezcla de disolventes se evapora bajo la campana por dejar el extracto bajo la campana 24 horas antes de administrarlo a los animales. El extracto se guardó en refrigeración a una temperatura de 3° a 4°C hasta que se utilizó. La mezcla de disolventes recuperados se utiliza nuevamente para repetir la desorción del material vegetal. La operación se realiza por 3 veces. El material vegetal desecado resultante se coloca disperso sobre el papel absorbente para permitir por evaporación, la eliminación de los restos de la mezcla de disolventes que utilizó en la desorción.

20 EJEMPLO No. 3

Caracterización fitoquímica de los extractos de *Salix babylonica* y *Leucaena leucocephala*

La separación fue lograda por columna capilar, RTX 5 MS (5% de fenil-metil-polisiloxano) (30 ml de largo, y 0,25 mm diámetro interno, 0,25 µm espesor cinematográfico). La temperatura de la columna fue mantenida en 50°C por 6 min y programado a 300°C a razón de 5°C/min. La tasa del flujo de helio (el gas de portador) fue 1 ml/min en el partido 20 ml/min de 0 a 0,01. Una alícuota (1 µL) de solvente que contiene el extracto de cada uno de *S. babylonica* y *L. leucocephala*, la mezcla fueron inyectados en la columna de GC con un calentador de inyector en 300°C causa que las sustancias químicas puedan llegar a ser gases. La MS fue operada (full scan-mode) en la ionización de impacto de electrón (EI-mod) en 70 voltios de electrón (eV). La temperatura de la fuente del ion fue 230°C. La MS fue escudriñada de 40 a 650 *m/z* con dos ritmos por segundo. Un integrador automáticamente calculado alcanza el máximo áreas.



Para la caracterización fitoquímica del extracto líquido de *S. babylonica* y *L. leucocephala* objeto de la invención con la cuantificación de los principios activos o compuestos químicos, se ha diseñado un protocolo específico de cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas marca *Varian Saturn 2100T 3900 GC/MS*. La separación y caracterización de la fitoquímica de los extractos fue lograda por una columna capilar, RTX 5 MS (5% de fenil-metil- polisiloxano) (30 ml de largo, y 0,25 mm diámetro interno, 0,25 μm espesor cinematográfico). La temperatura de la columna fue mantenida en 50°C por 6 min y programado a 300°C a razón de 5°C/min. La tasa del flujo de helio fue 1 ml/min en el partido 20 ml/min de 0 a 0,01. Para la determinación de la concentración de compuestos activos se utiliza la referencia del espectro de masas (MS) para determinar e identificar los compuestos en el laboratorio de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, y cuya identidad fue corroborada por cooperación con los datos espectroscopios reportados. La MS fue operada (full scan-mode) en la ionización de impacto de electrón (EI-mod) en 70 voltios de electrón (eV). La temperatura de la fuente del ion fue 230°C. La MS fue escudriñada de 40 a 650 m/z con dos ritmos por segundo. Un integrador automáticamente calculado alcanza el máximo de áreas. El extracto objeto (1 μL) de la invención de solvente que contiene el extracto de cada uno de *L. leucocephala*, *S. babylonica* y la mezcla fueron inyectados en la columna de GC con la calentadora de inyector en 300°C causar que las sustancias químicas a llegar a ser gases. Cada muestra se corre por triplicado. El perfil cromatográfico es analizado en un intervalo de longitudes de onda entre 200 y 400 nm, fijado la lectura a 220 nm. la curva de calibración se obtiene por medición del área bajo la curva ($R^2 > 0.98$) del compuesto respectivo, acorde con los siguientes valores mostrados en las figuras 1, 2 y 3 así como las tablas 1, 2 y 3. Dichas muestras fueron analizadas por triplicado y provenientes de tres extractos independientes. Finalmente, el extracto objeto de la invención tiene una concentración de compuestos químicos identificados y presentados en las siguientes tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Compuestos químicos identificados en el extracto de las hojas de *L. leucocephala* por el análisis de GC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención		PM ^a	Fórmula química	Area (%) ^b
	(min)				
	Determinado	Autentico			
2(4H)-benzofuranona, 5,6,7,7a-	12.570	12.739	180.24	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	23.09



tetrahydro-4,4,7a-trimetil-, (r)-					
Dietil ftalato (Ácido 1,2-benzenedicarboxílico)	13.307	13.307	222.24	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1.013
1-Nonadecano	14.261	14.261	268	C ₁₉ H ₄₀	1.36
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)	15.650	15.650	296.53	C ₂₀ H ₄₀ O	1.91
6,10,14-trimetil 2-pentadecanono	15.736	15.736	268.47	C ₁₈ H ₃₆ O	4.17
Ácido Pentadecanoico, 14-dimetil-ester	16.270	16.489	270.1	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	8.20

^a Peso molecular del compuesto (g/mol).

^b Concentración sobre el área total de cada curva (peak) identificado.

5

Tabla 2. Compuestos químicos identificados en el extracto de las hojas de *S. babylonica* por el análisis de GC-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)		PM ^a	Fórmula química	Area (%) ^b
	Determinado	Auténtico			
2-hidroxi-6-metil- benzaldehido	7.730	7.788	136.15	C ₈ H ₈ O ₂	0.994
2-Metoxi-4-vinil-fenol	9.752	9.752	150	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.36
Butilato de hidroxi-tolueno	12.327	12.327	220.2	C ₁₅ H ₂₄ O	0.66
Hexatricontano	13.193	13.193	506.97	C ₃₆ H ₇₄	0.77
Nonadecano	14.257	14.266	268.52	C ₁₉ H ₄₀	1.168
Ácido Tridecanoico, 1,2-dimetil-ester	14.464	14.547	242.39	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.67
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	15.689	15.645	296.53	C ₂₀ H ₄₀ O	9.72
Ácido Hexadecanoico, metil ester (ácido palmítico, metil ester)	16.452	16.452	270.45	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	14.97
Ácido 9-octadecenoico, 1,2,3-propanetril ester, (E,E,E)-	17.980	17.985	885.43	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	11.05
Ácido Octadecanoico, metil ester	18.167	18.170	296.49	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1.68

1,3-dioxano, 4-(hexadeciloxi)-2-pentadecil	18.716	18.722	517	$C_{35}H_{49}O$	10.33
Tritetracontano	19.488	19.487	605.15	$C_{43}H_{88}$	15.21
1-pentacontanol	21.625	21.625	719.34	$C_{50}H_{102}O$	0.97

^a Peso molecular del compuesto (g/mol).

^b Concentración basa sobre el área total de cada curva (peak) identificado.

5

Tabla 3. Compuestos químicos identificados en la mezcla de los extractos de *L. leucocephala* and *S. babylonica* por el análisis de GC-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)		PM ^a	Fórmula química	Area (%) ^b
	Determinado	Autentico			
Ácido 9-Oxononanoico, metil ester	11.293	11.299	186.24	$C_{10}H_{18}O_3$	0.77
Ácido 7,10-Hexadecadienoico, metil ester	12.715	12.707	266.41	$C_{17}H_{30}O_2$	0.307
Biciclo[10.1.0]tridec-1-ene	13.049	13.049	178	$C_{13}H_{22}$	0.139
Dietil ftalato	13.281	13.290	222.24	$C_{12}H_{14}O_4$	0.88
3,7,11, 15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	15.647	15.647	296.53	$C_{20}H_{40}O$	0.98
6,10,14-Trimetil, 2-pentadecanona	15.723	15.723	268.47	$C_{18}H_{36}O$	0.46
Ácido 9-Hexadecenoico, metil ester	16.279	16.279	268.43	$C_{17}H_{34}O_2$	0.29
Ácido Hexadecanoico, metil ester	16.443	16.452	270.2	$C_{17}H_{34}O_2$	9.017
Dibutil ftalato	16.892	16.892	278.34	$C_{16}H_{22}O_4$	0.403
Ácido 9,12-Octadecadienoico, metil ester	17.941	17.936	294.47	$C_{19}H_{34}O_2$	11.24
Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, etil ester (Z,Z,Z)	18.007	18.007	306.48	$C_{20}H_{34}O_2$	29.40

Ácido Octadecanoico, 16-dimetil ester	18.165	18.165	312.53		
Ácido 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico, metil ester	18.379	18.348	330.50	$C_{22}H_{34}O_2$	2.03
Ácido Nonanoico, 9-(o-propilfenil), metil ester	18.427	18.427	290.2	$C_{19}H_{30}O_2$	0.504
Ácido Oxaciclodecadieno-4,11-diino	18.490	18.490	190	$C_{13}H_{18}O$	0.094
Triciclo[7,4,0,0(3,8)]tridec-12-en-2-ona, 5,6-epoxi-4-metil-1-(2-propinil)	18.578	18.578	256.33	$C_{17}H_{20}O_2$	0.905
2-Pentadecil-4-(hexadeciloxi)-1,3-dioxano	18.720	18.664	538	$C_{35}H_{70}O_3$	12.867
Ácido Hexacontanoico	20.238	20.238	874	$C_{60}H_{122}O_2$	2.09
Tritetracontano	20.943	20.944	605.15	$C_{43}H_{88}$	3.20

^a Peso molecular del compuesto (g/mol).

^b Concentración sobre el área total de cada curva (peak) identificado.

5

EJEMPLO No. 4

Evaluación de los extractos de *Salix babylonica*, *Leucaena leucocephala* para tratar enfermedades parasitarias en el ganado ovino

10

i. Animales y los tratamientos

En esta invención se utilizaron 16 corderos, con un peso promedio de 24.5 kg de peso vivo y edad de 4 a 5 meses. Los cuales se utilizando 4 tratamientos con 4 corderos (raza de Katahdin×Pelibuey) por tratamiento, en 3 periodos experimentales con una duración de 20 días/periodo, dando un total de 60 días (20 días (Periodo1), 40 días (Periodo 2) y 60 días (Periodo 3) del tratamiento con los extractos. La descripción de los tratamientos y el número de los corderos utilizados son en la tabla 4.

15





Tabla 4. Descripción de los tratamientos y el número de los corderos en cada grupo experimental.

Tratamiento	No. de corderos	Descripción
Control	4 corderos	Dieta base (maíz, sorgo, pasta de soya y harina de pescado con sus respectivas premezclas de vitaminas y minerales)
<i>S. babylonica</i>	4 corderos	Dieta base + Extracto de <i>S. babylonica</i> (30 ml/día/animal)
<i>L. leucocephala</i>	4 corderos	Dieta base + Extracto de <i>L. leucocephala</i> (30 ml/día/animal)
<i>S. babylonica</i> + <i>L. leucocephala</i>	4 corderos	Dieta base + Extracto de <i>S. babylonica</i> (15 ml/día) + <i>L. leucocephala</i> (15 ml/día/animal) = 30 ml/día/animal

5 La toma de las muestras de heces para la evaluación de los extractos fue en tres periodos experimentales después 20 días (Periodo 1), 40 días (Periodo 2) y 60 días (Periodo 3) tras la administración oral de los extractos a los corderos.

ii. **Recolección y análisis de muestras de heces**

10 La recolección de muestras se realizó en las mañanas, se recolectaron las muestras de heces una hora antes de la alimentación (a las 7:00 horas) se recolectaron muestras de manera individual, de cada animal dentro cada tratamiento, de heces directamente de la ampolla rectal con la ayuda de guantes de látex esterilizados, se utilizaron bolsas plásticas esterilizadas previamente identificadas con el número de cada animal, y se trasladaron
 15 inmediatamente al laboratorio. En el laboratorio las muestras fueron preparadas con la técnica de flotación para el examen parasitológico utilizando una solución sobresaturada de nitrato de sodio. Posteriormente se cuantificó e identificó la presencia de posibles nematodos gastrointestinales por gramos de heces y posteriormente se determinó la acción de los

extractos en la reducción y eliminación de dichos parásitos identificados por el examen parasitológico.

iii. Examen parasitológico

5

Se utilizó una técnica de flotación por nitrato de sodio para el examen parasitológico de las muestras de heces colectadas en ovinos. En las heces pueden aparecer elementos no fecales como moco o restos de tejido conjuntivo. La presencia de mucus es indicio de irritación compatible con la existencia de un parasitismo; la de tejido conjuntivo, en cambio, puede revelar una deficiencia digestiva independiente de la presencia o no de parásitos intestinales. De cada una de las diferentes partes, si se trata de unas heces heterogéneas en su consistencia: duras, blandas, líquidas, mucosanguinolentas, etc. deberán separarse pequeñas fracciones para realizar con ellas un examen microscópico, siguiendo las pautas que más adelante se indican.

10

15

20

25

30

La investigación de parásitos oseudoparásitos macroscópicamente visibles en heces, implica la necesidad de diluir la totalidad de la muestra recibida en suficiente cantidad de agua o solución salina fisiológica. Se preparó en un vaso de cristal de 1 L de volumen una solución sobresaturada salina fisiológica del nitrato de sodio, para ello se agregó un exceso de la solución de nitrato de sodio en agua destilada. Dos gramos de heces frescas, inmediatamente colectadas de los ovinos, fueron mezcladas con 20 mL de la solución sobresaturada de nitrato de sodio, en un mortero, se coló la suspensión de heces después y con ayuda de un colador metálico de malla fina (1 mm), se llenó completamente un tubo de ensayo y otro tubo de ensayo de lados paralelos hasta que el líquido alcanzó el borde, se tapó mediante un cubreobjetos. La dilución de la masa fecal puede realizarse a mano, en un mortero adecuado, o mejor, con un agitador mecánico. Lo importante es realizar la incorporación del diluyente muy lentamente, sobre todo al principio, para conseguir una suspensión fecal con aspecto de líquido turbio. Esta suspensión se deja reposar media hora y después se decanta el sobrenadante; seguidamente se añade un nuevo volumen de diluyente y tras agitar y dejar repasar se decanta de nuevo. Estas operaciones se repiten hasta que el sobrenadante quede claro. Posteriormente, el sedimento se pasará en alícuotas a un recipiente, cristizador, de gran superficie y pequeña altura. El líquido debió estar en contacto con el cubreobjetos, se dejó el tubo en posición vertical por espacio de 10 minutos, se quitó el cubreobjetos mediante unas pinzas pequeñas y se colocó, con la parte húmeda hacia abajo sobre un portaobjetos y se procedió al examen microscópico directo. Cada



alícuota debe ser observada por medio de un microscopio estereoscópico sobre fondo claro y oscuro alternativamente, operación que se continuará hasta haber observado la totalidad de la suspensión fecal. Con este procedimiento se pueden detectar adultos y larvas de nematodos, adultos de trematodos y cestodos y larvas de moscas que por su tamaño son directamente visibles. La diferenciación primaria entre estos grupos de parásitos y pseudoparásitos macroscópicos puede establecerse de acuerdo con una serie de características morfológicas.

Para el conteo y la identificación de los parásitos, se utilizó un microscopio electrónico conectado con una computadora (Lap Top) para contar e identificar las especies parasitarias en las muestras de heces previamente colectadas de los ovinos en el experimento. Su mecanismo de acción se basó en mezclar las heces con una solución de diferente densidad a la de los elementos parasitarios, de tal forma que si la densidad del líquido reactivo es menor y estos se depositan en el fondo; por el contrario, si es mayor, flotarán en su superficie. Las especies parasitarias que fueron identificadas son: *Haemonchus* sp; *Ostertagia* sp; *Oesophagostomum* spp; *Cooperia* sp; *Bonostomum* sp; *Nematodirus battus*; *Chaberita* sp; *Strongiloides papillosus*; *Nematodirus spathiger*. Las variables analizadas demostraron la disminución de parásitos por gramo de heces (frecuencia de parásitos en el tracto gastrointestinal) y se muestran los resultados en las figuras 21 a 30.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito de manera suficiente y clara mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. Mezcla antiparasitaria con efecto sinérgico caracterizada porque comprende un extracto 1:1 (v/v) de *S. babylonica* y un extracto de *L. leucocephala*.
2. Mezcla antiparasitaria de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto de *L. leucocephala*, comprende los porcentajes de los compuestos identificados en la Tabla 1.
3. Mezcla antiparasitaria, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto de *S. babylonica* comprende los porcentajes de los compuestos identificados en la Tabla 2.
4. Mezcla antiparasitaria de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la combinación de los extractos de *L. leucocephala* y *S. babylonica* comprende los porcentajes de los compuestos identificados en la Tabla 3.
5. Mezcla antiparasitaria de un extracto de *S. babylonica* y *L. leucocephala* de conformidad con las reivindicaciones anteriores para usarse para la reducción de la carga parasitaria en ovinos en donde dicha mezcla es administrable en forma oral.
6. Mezcla antiparasitaria de conformidad con las reivindicaciones anteriores para usarse para la reducción de la carga parasitaria en ovinos en un periodo de 60 días y donde la dosis del extracto es de 30 ml extracto/día.
7. Mezcla antiparasitaria de conformidad con las reivindicaciones anteriores para usarse para la reducción de la carga parasitaria en ovinos donde dicha mezcla es administrable en 3 dosis con una duración de 20 días/dosis y donde el nivel del extracto es de 30 ml extracto/día.



5 8. Mezcla antiparasitaria de conformidad con las reivindicaciones anteriores para usarse para la reducción de la carga parasitaria en ovinos donde dicha mezcla disminuye la carga parasitaria en un promedio de 40% cuando es administrado en una dosis de 30 ml extracto/día.

10 9. Una mezcla de extractos de *S. babylonica* y *L. leucocephala* de conformidad con las reivindicaciones anteriores para preparar una formulación farmacéutica veterinaria para la reducción de la carga parasitaria en ovinos.

15 10. Formulación farmacéutica veterinaria caracterizada porque comprende una mezcla de extracto de *S. babylonica* y un extracto de *L. leucocephala* de conformidad con las reivindicaciones anteriores.

**RESUMEN**

La presente invención se refiere a la formación y preparación de una mezcla antiparasitaria de un extracto líquidos de *S. babylonica*, *L. leucocephala* y la combinación de los dos extractos (1:1, v/v) que comprenden para el tratamiento de la carga parasitaria en ovinos, donde los agentes activos son los compuestos metabolitos en tablas 1, 2 y 3; y las figuras del 1 al 20. El proceso para la obtención de dichos extractos logra un notable aumento en la concentración de los compuestos activos, y adicionalmente, permite la preparación de extractos líquidos que por su apariencia translúcida tiene mayor aceptación y práctico por los ovinos. La formulación, objeto de la invención, produce un mayor efecto antihelmíntico que los extractos reportados en el estado de la técnica y sin los efectos adversos de los fármacos que se emplean actualmente en los tratamientos de la enfermedad parasitaria en ovinos.



Figura 1

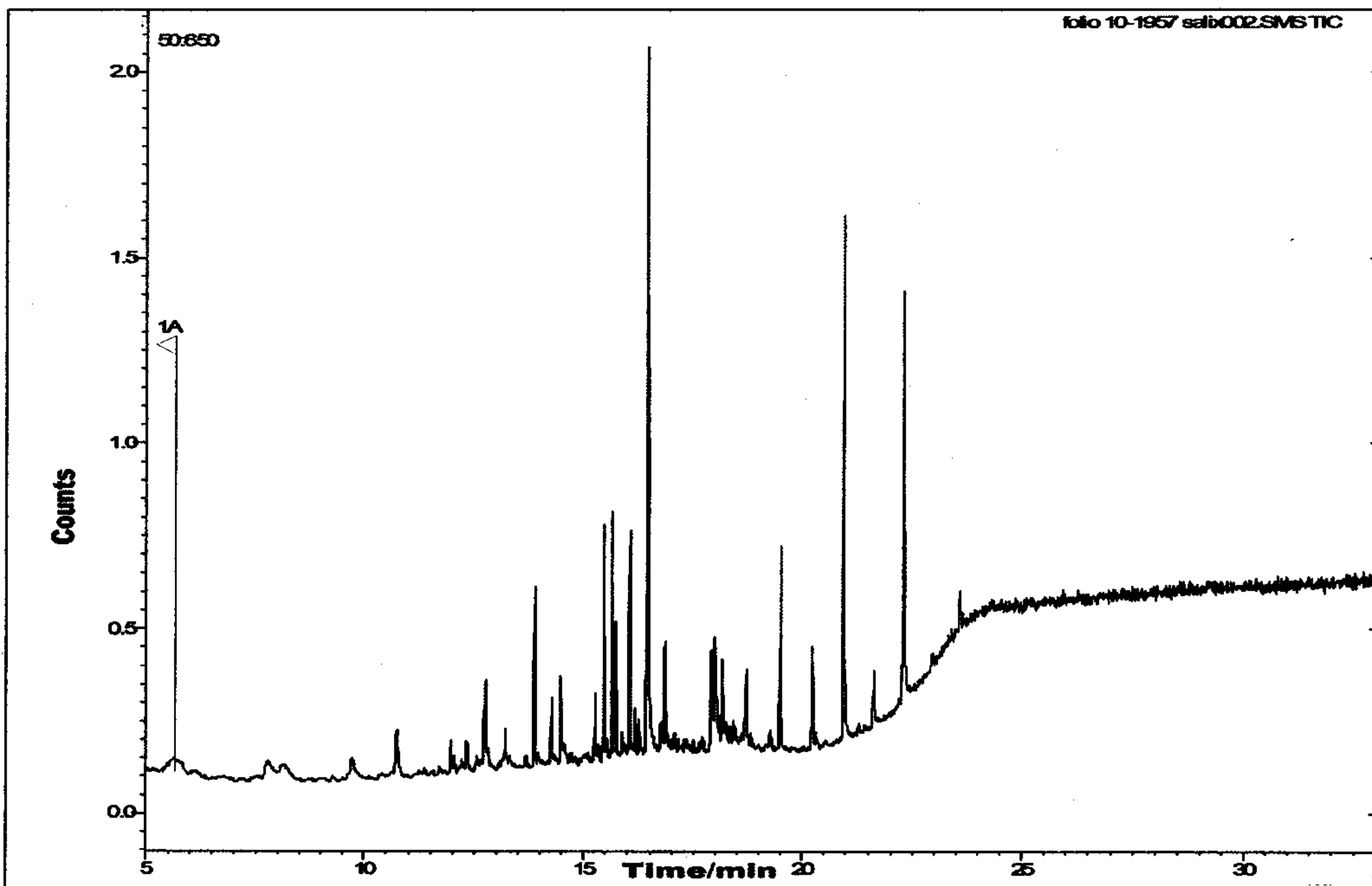
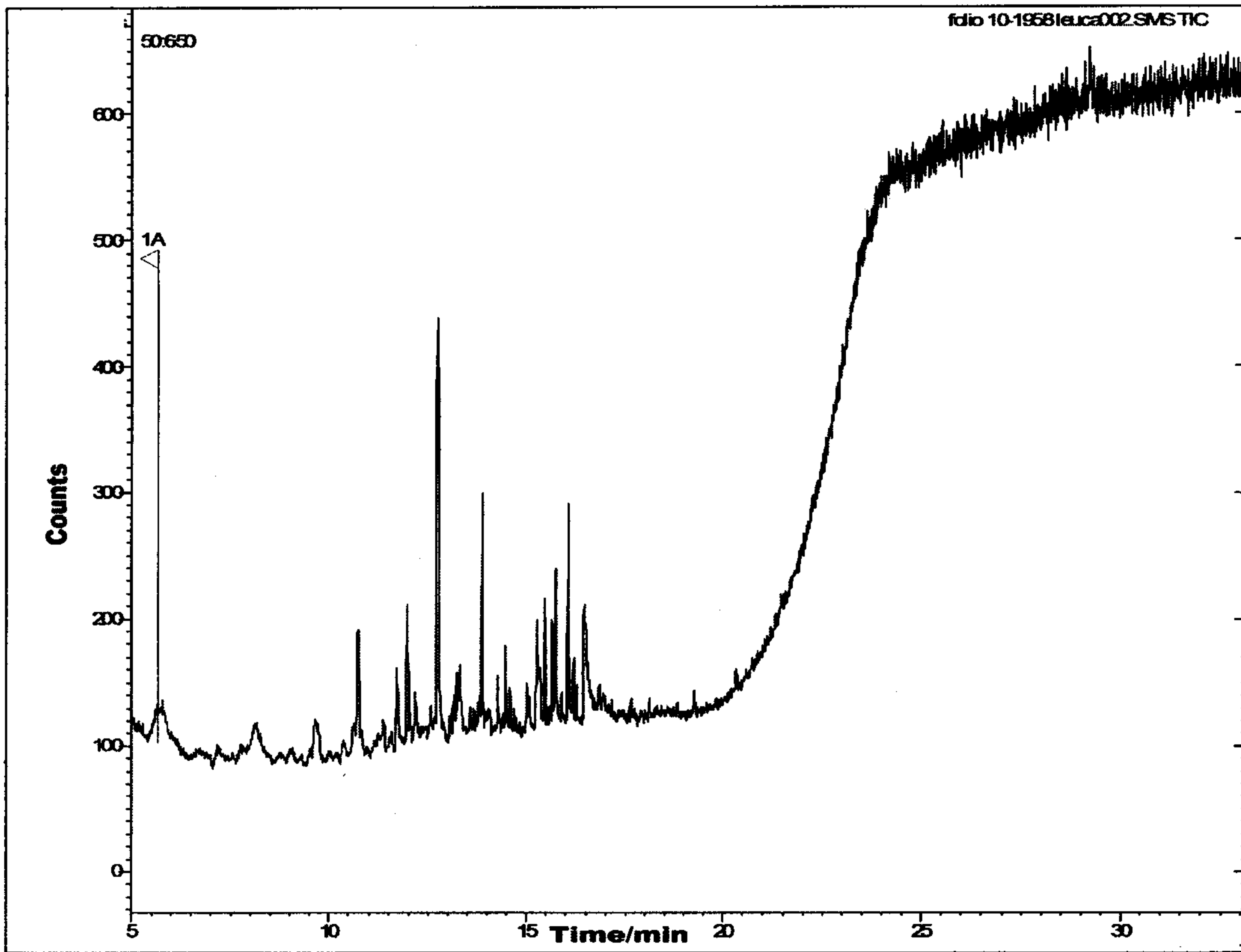




Figura 2



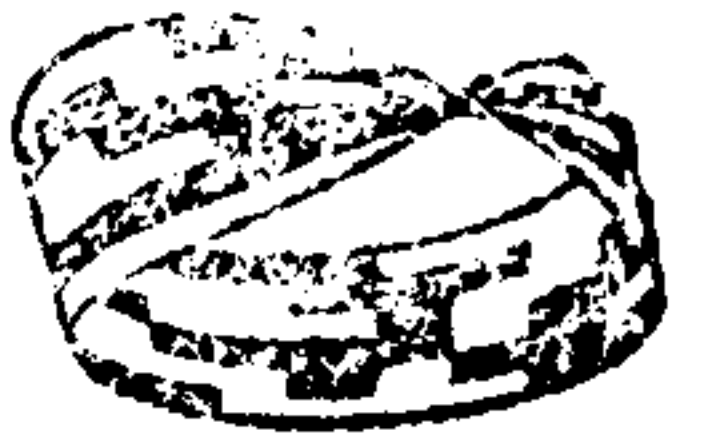


Figura 3

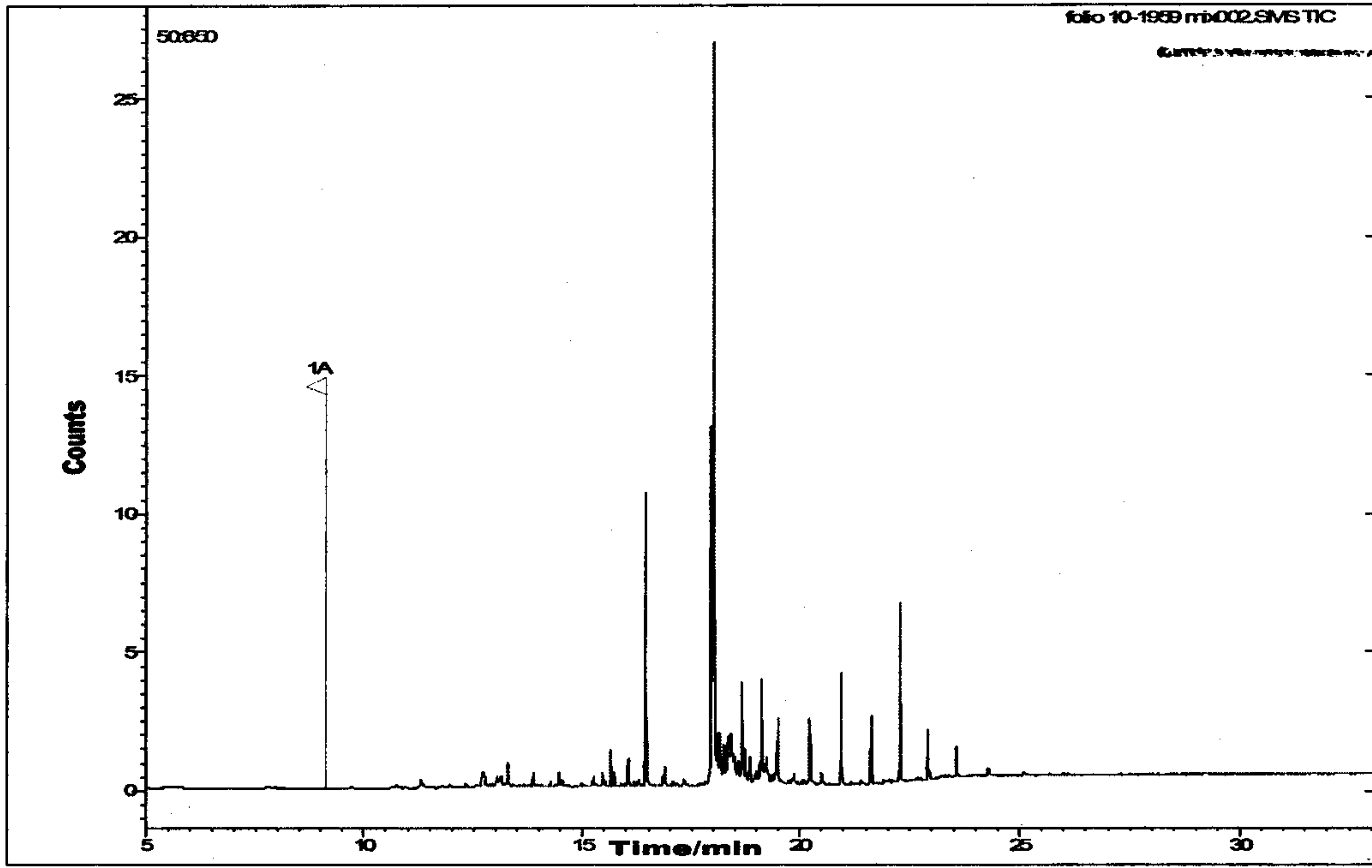




Figura 4

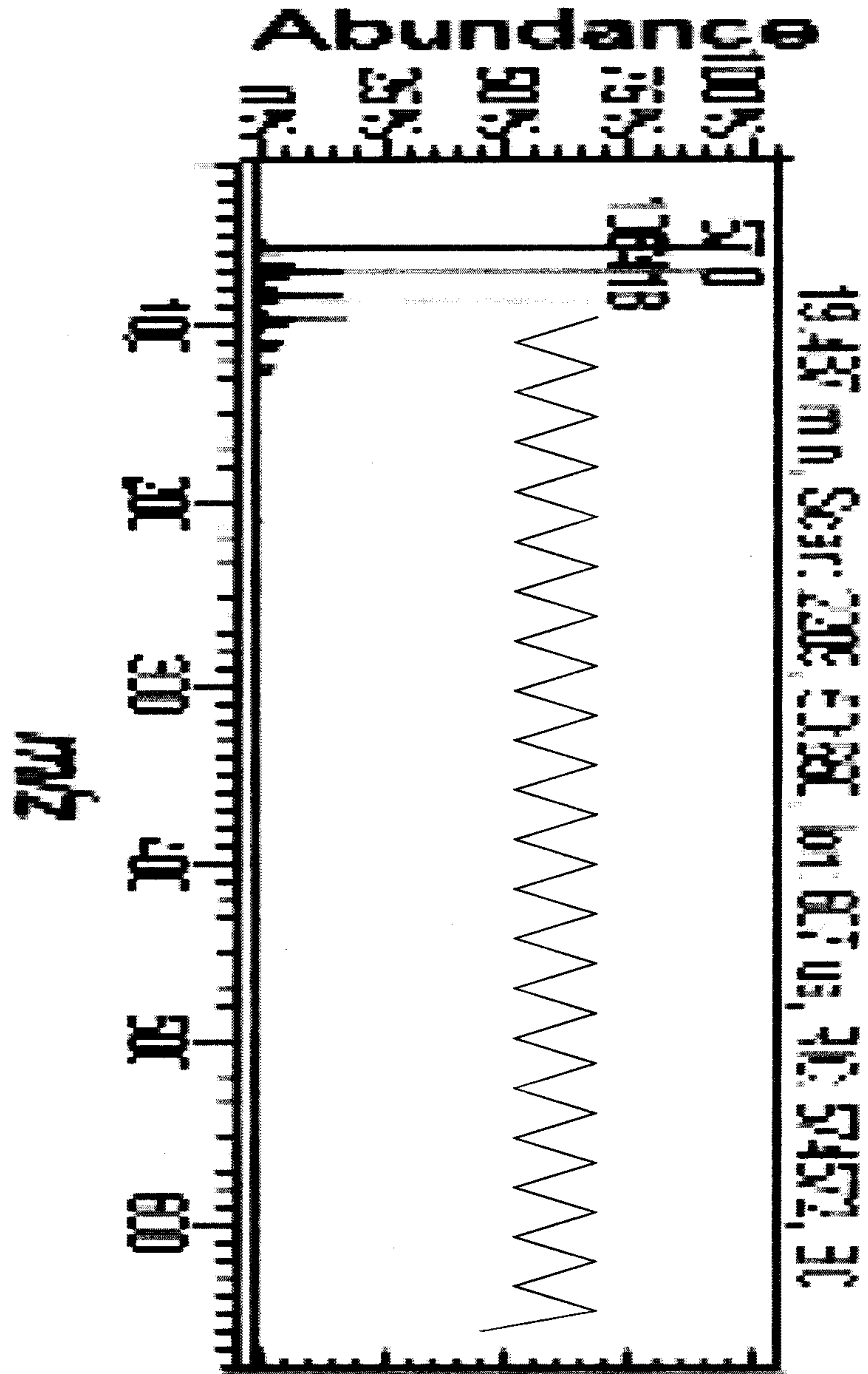


Figura 5

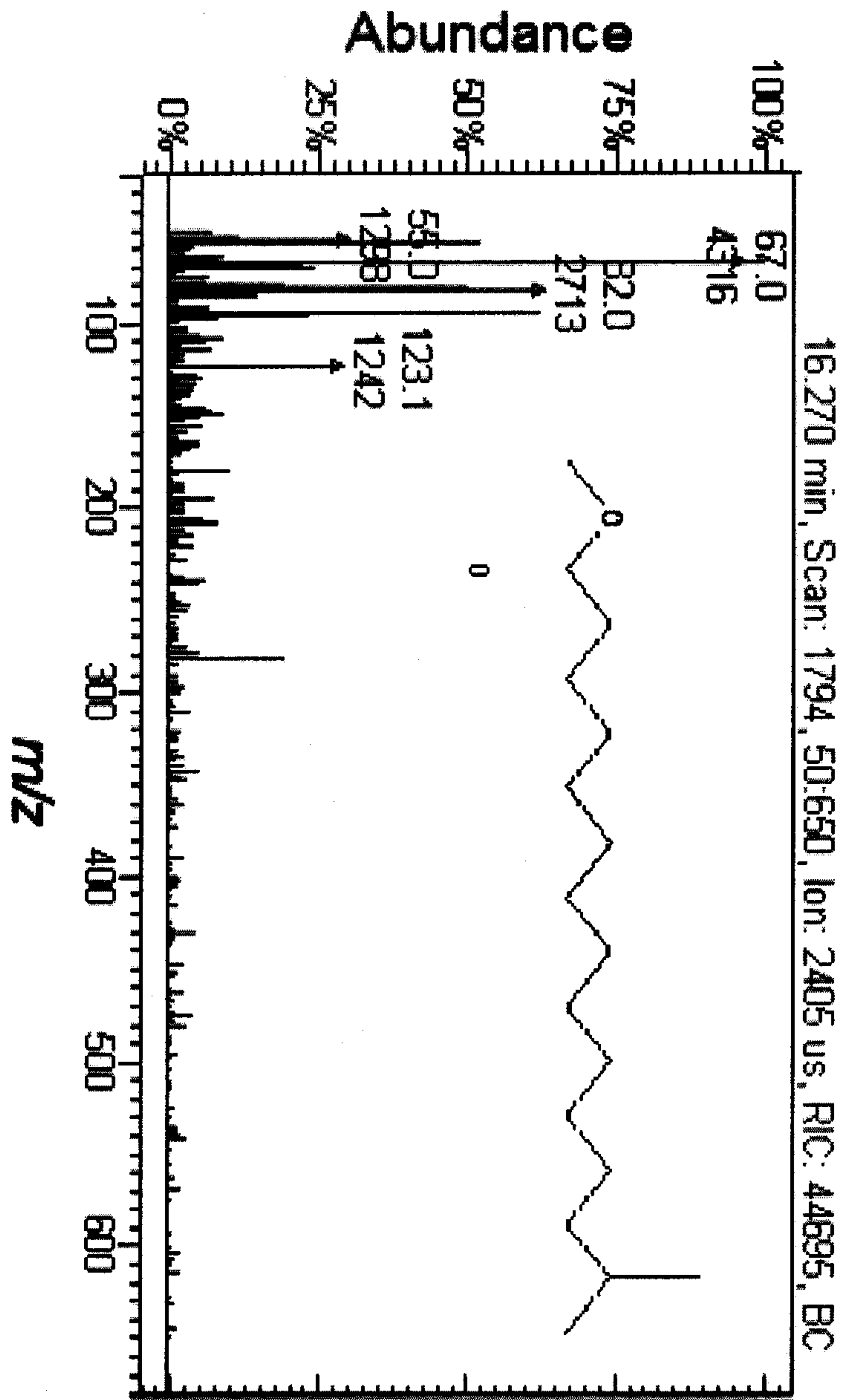


Figura 6

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

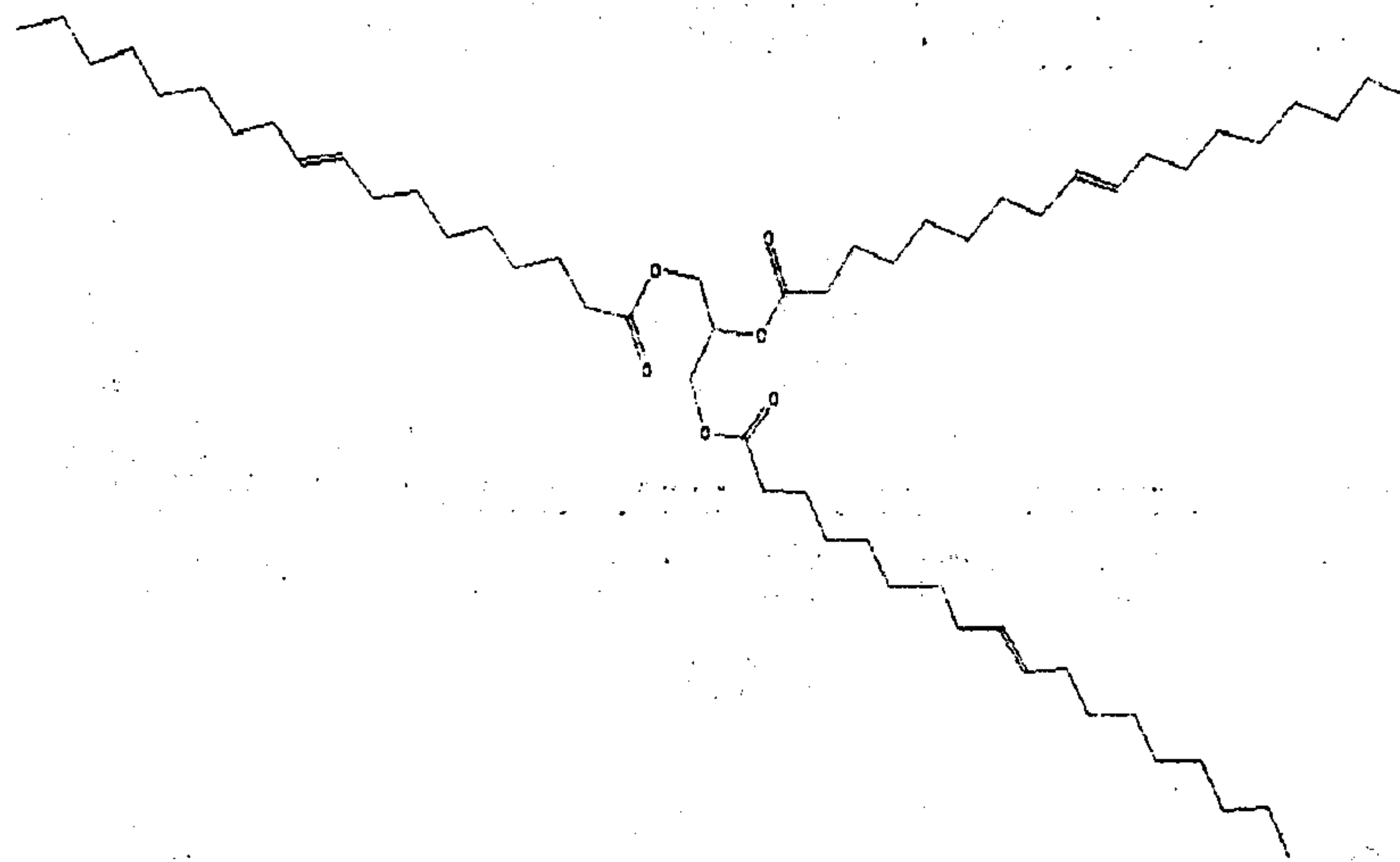
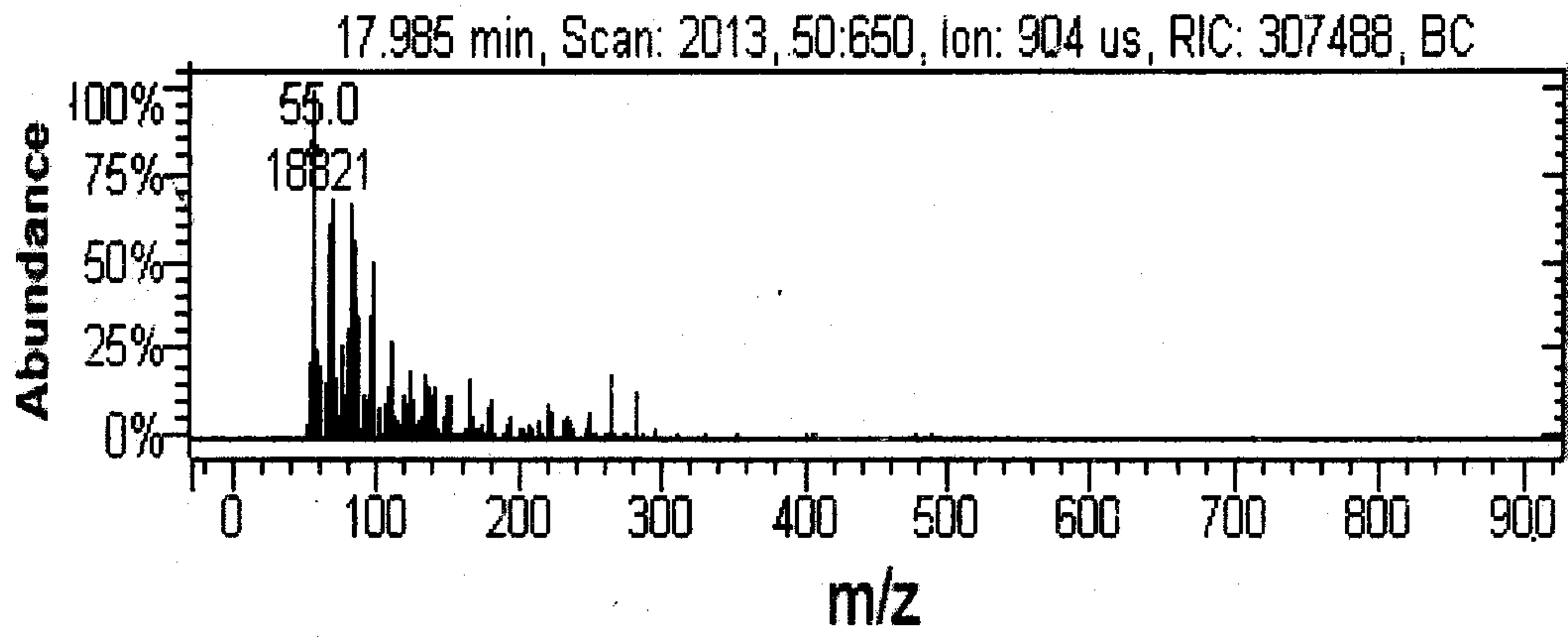


Figura 7

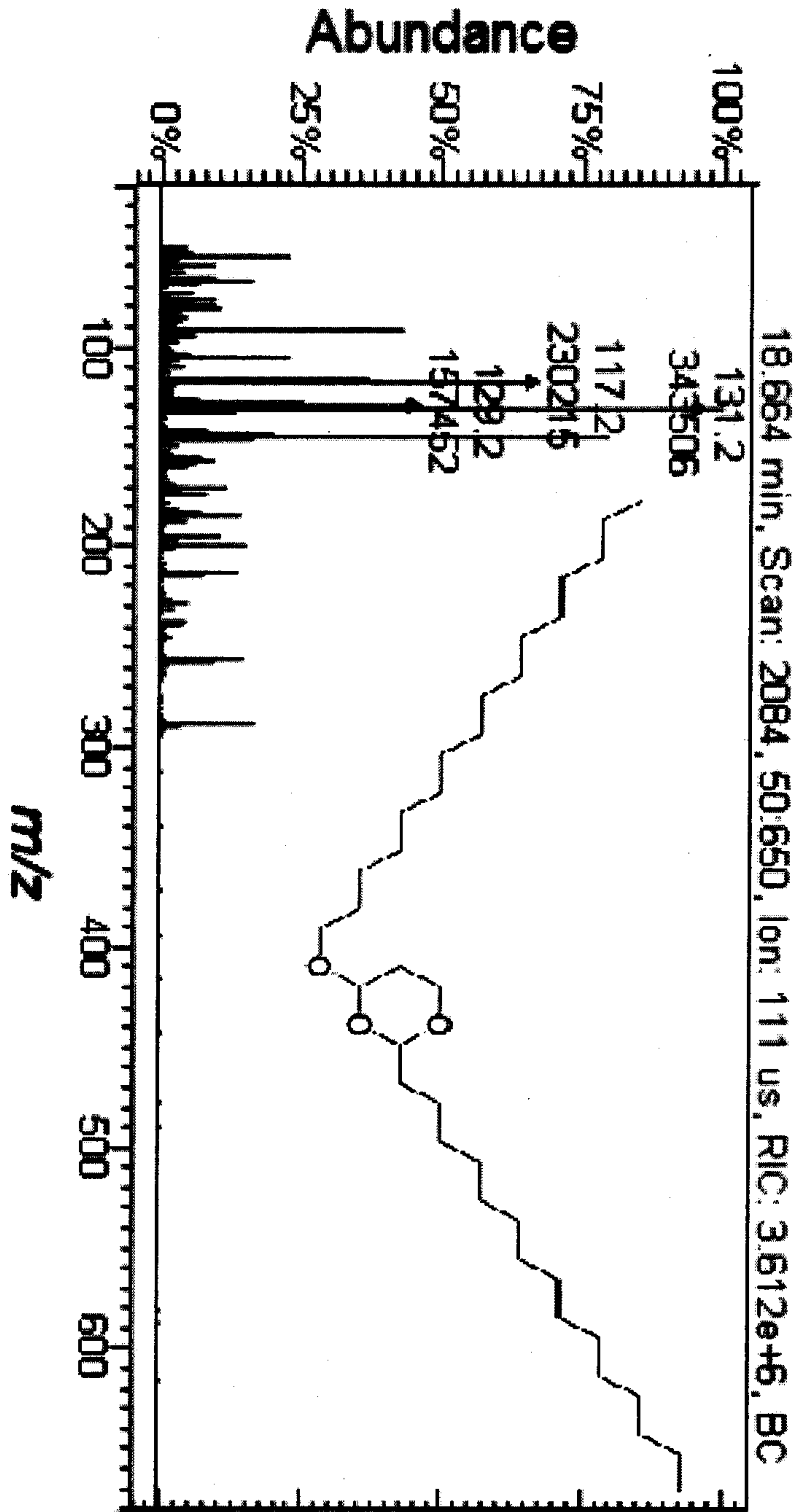




Figura 8

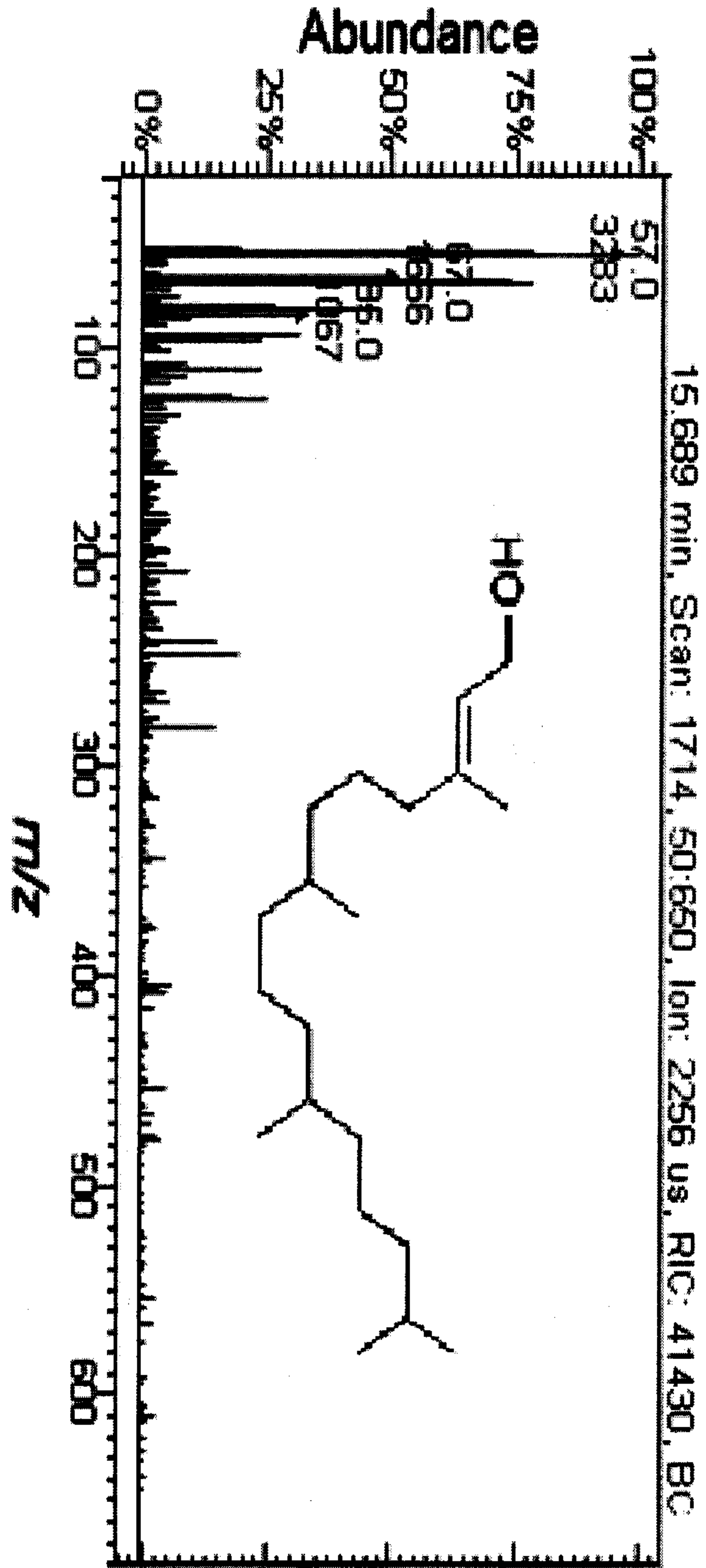


Figura 9

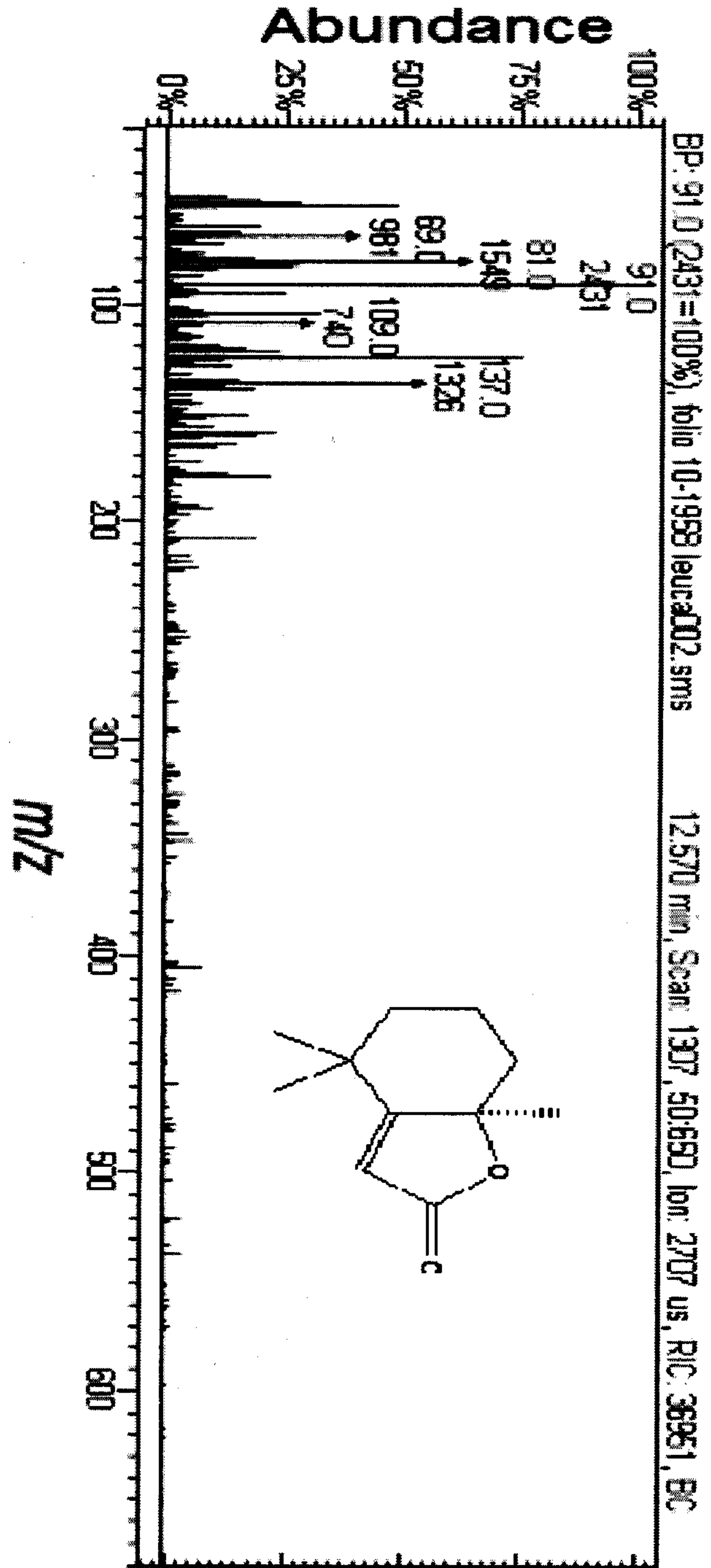


Figura 10

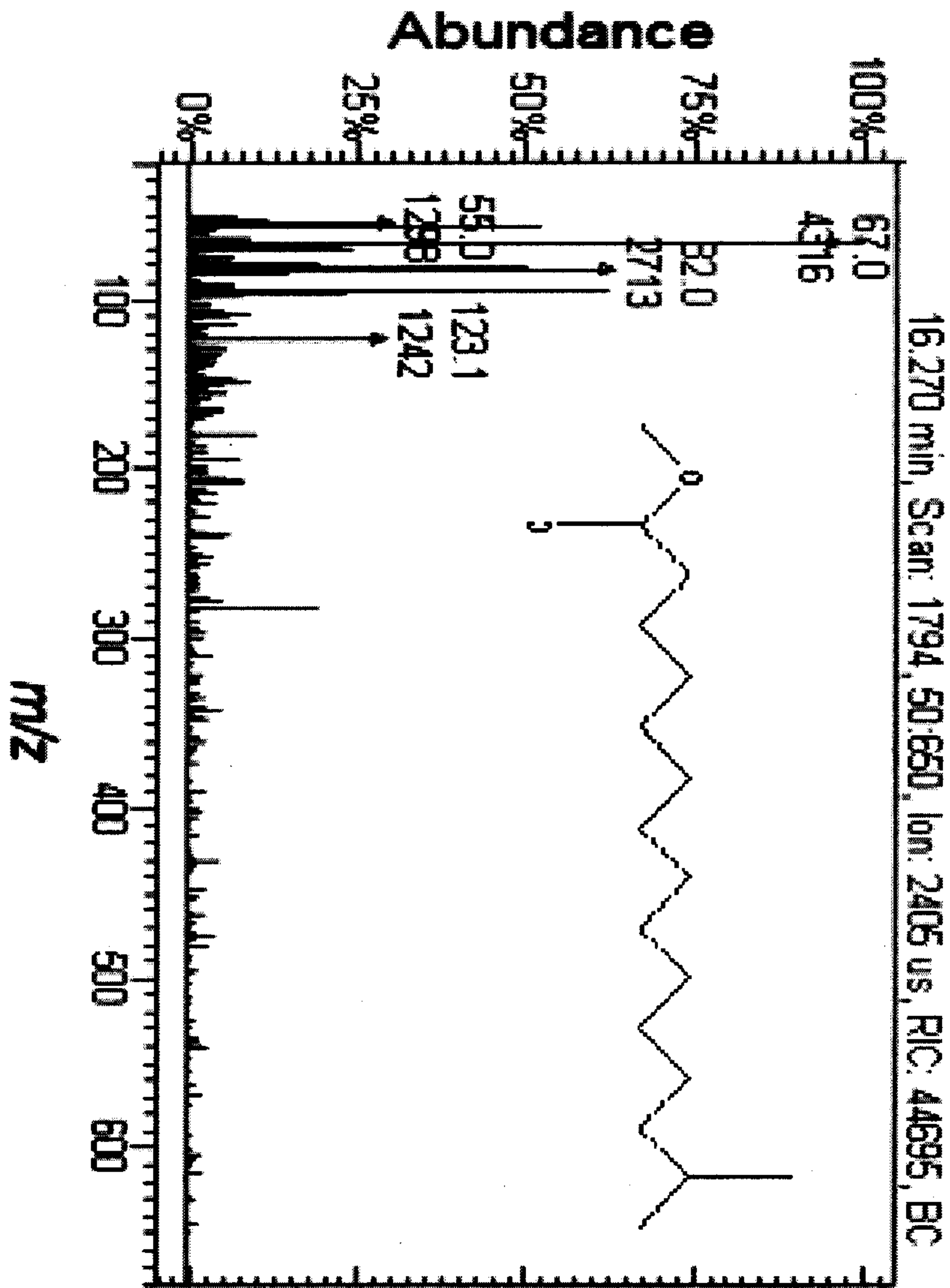
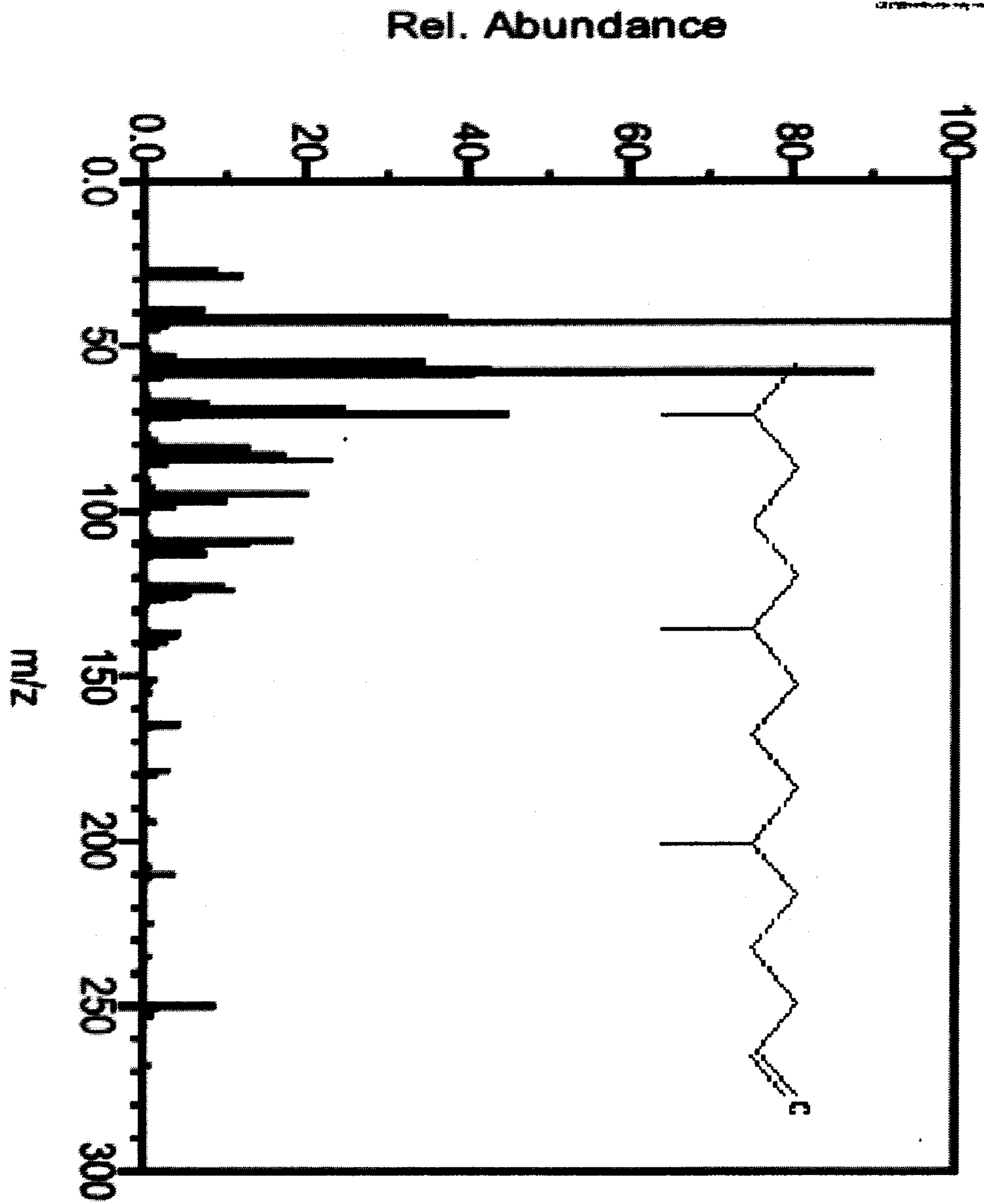




Figura 11



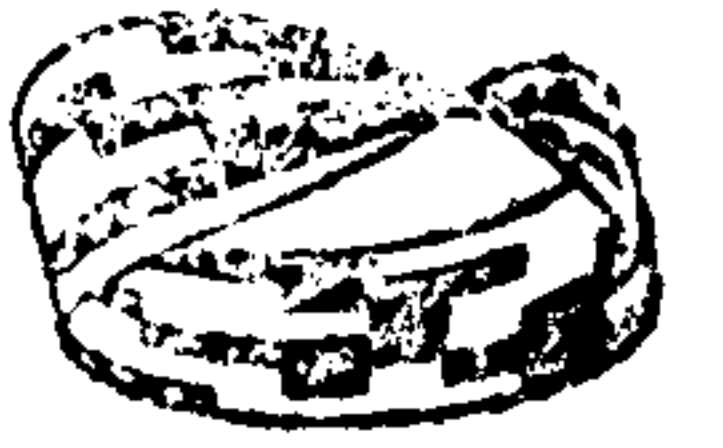


Figura 12

Rel. Abundance

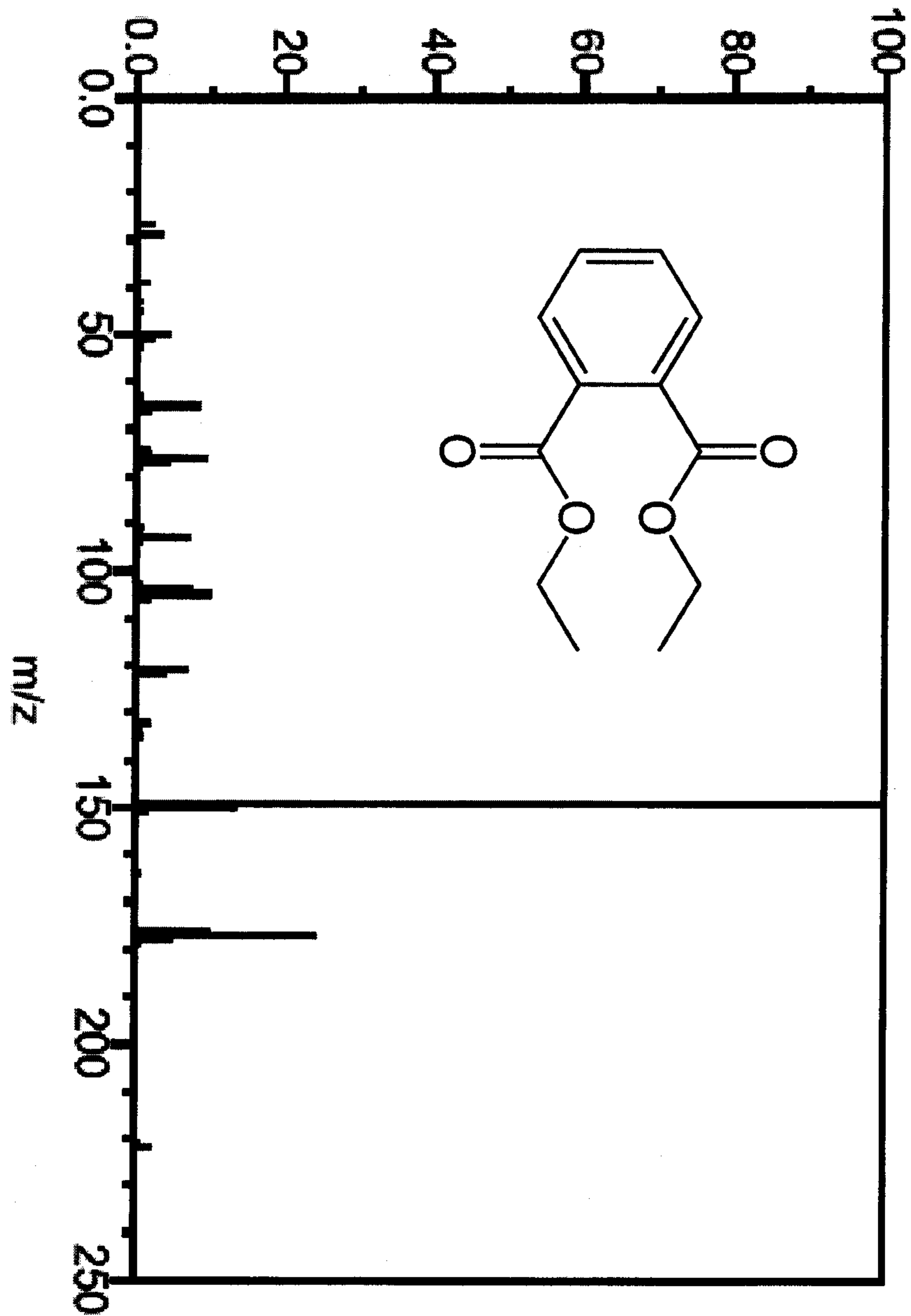


Figura 13

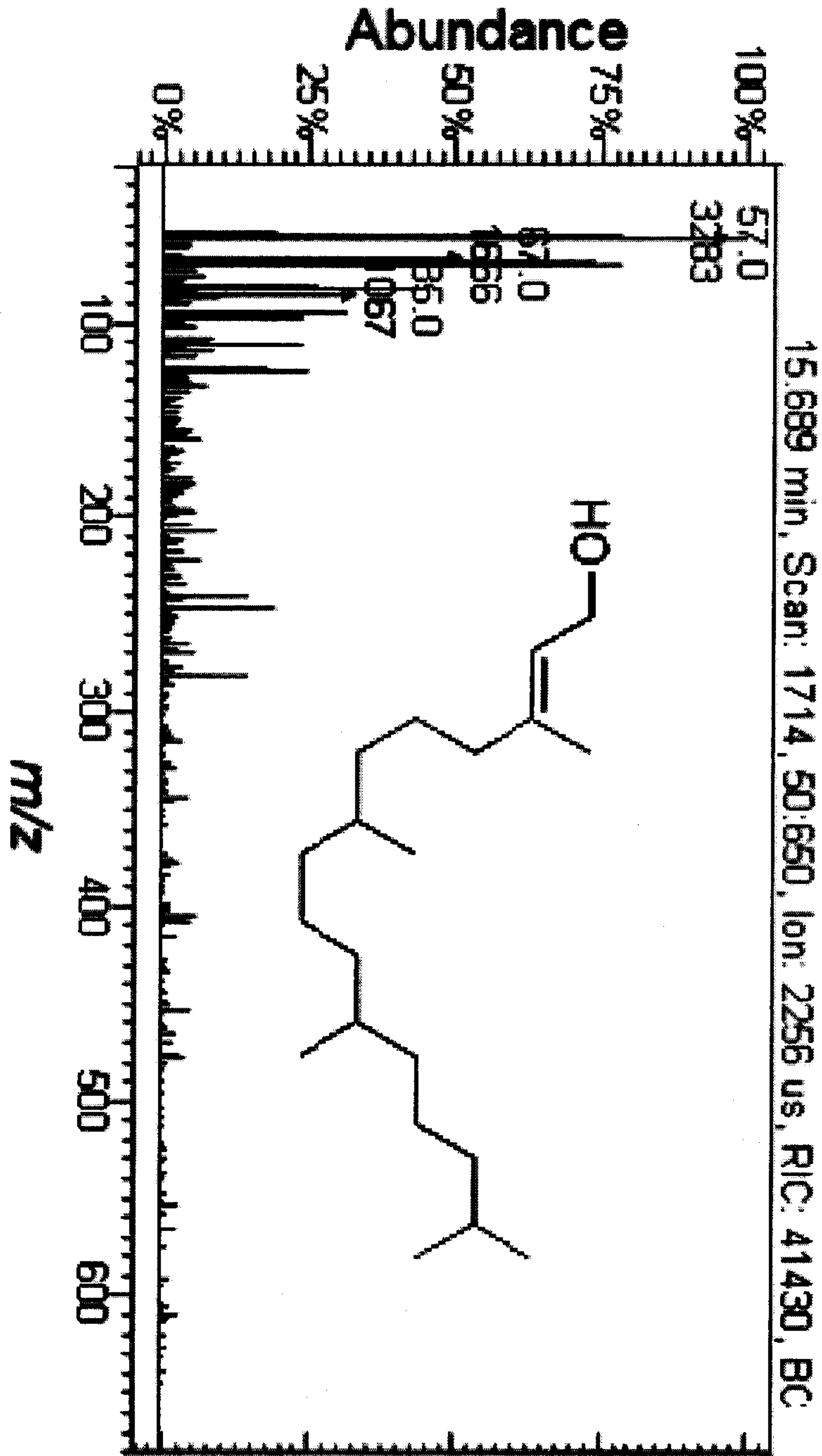




Figura 14

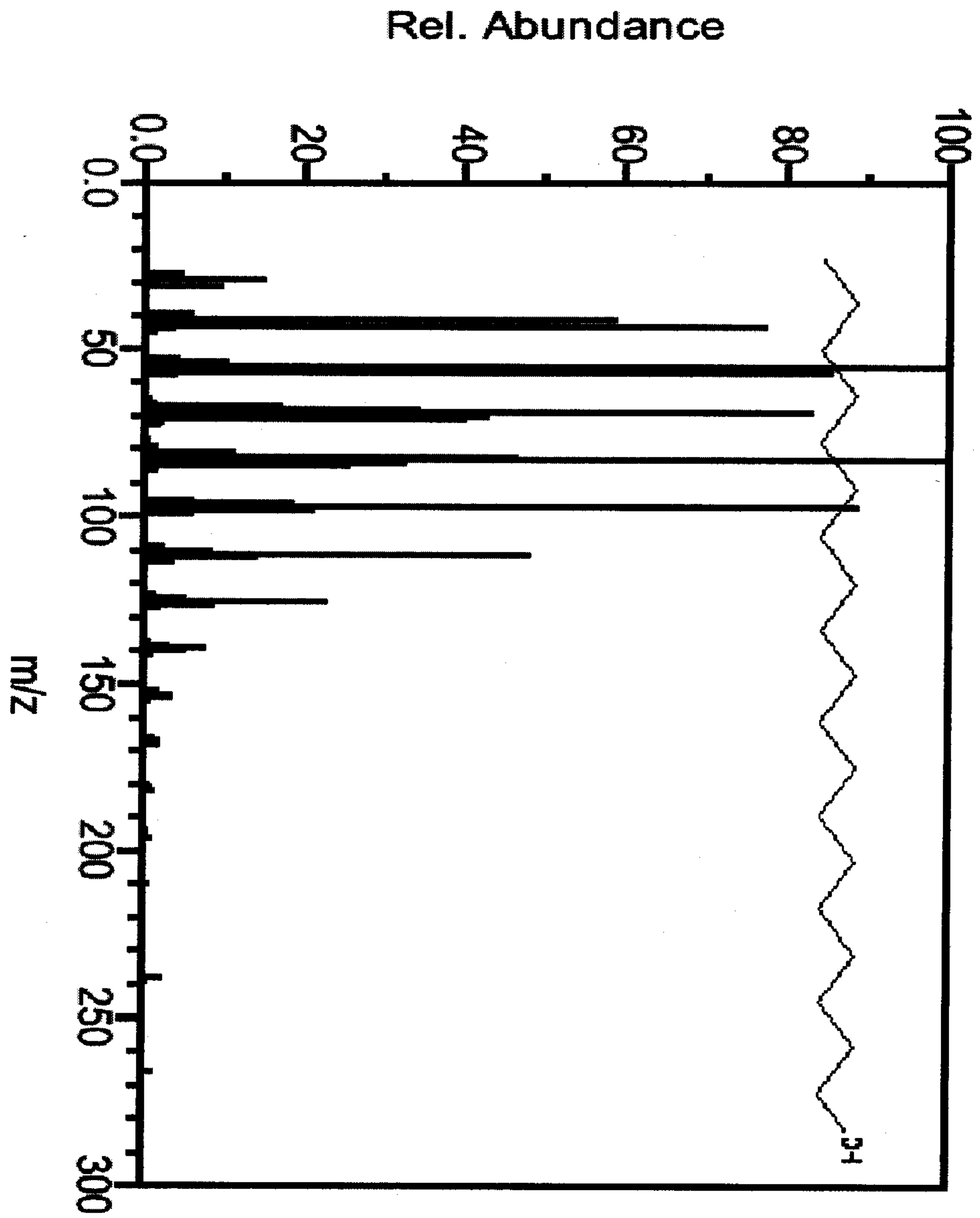


Figura 15

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

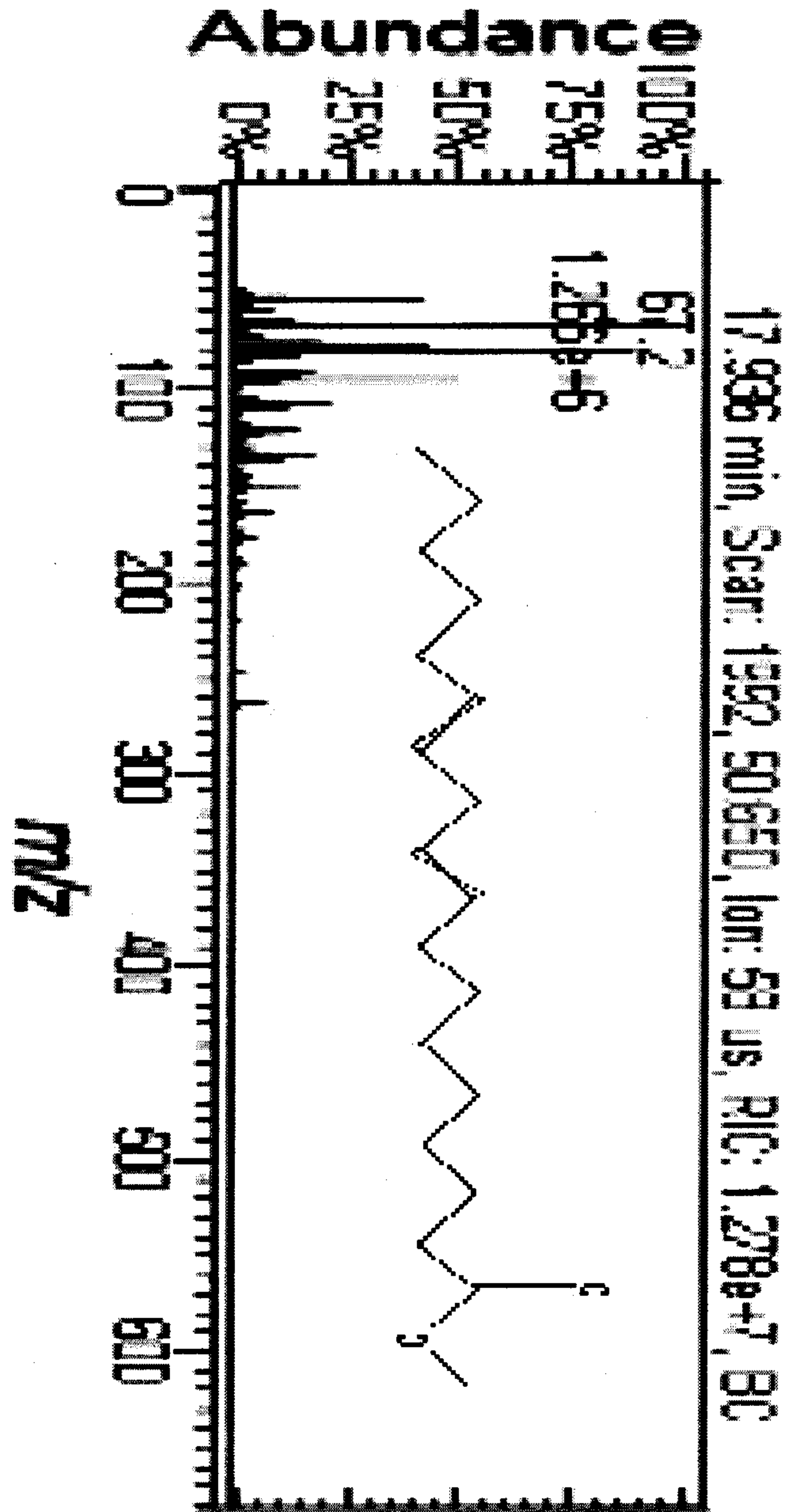


Figura 16

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

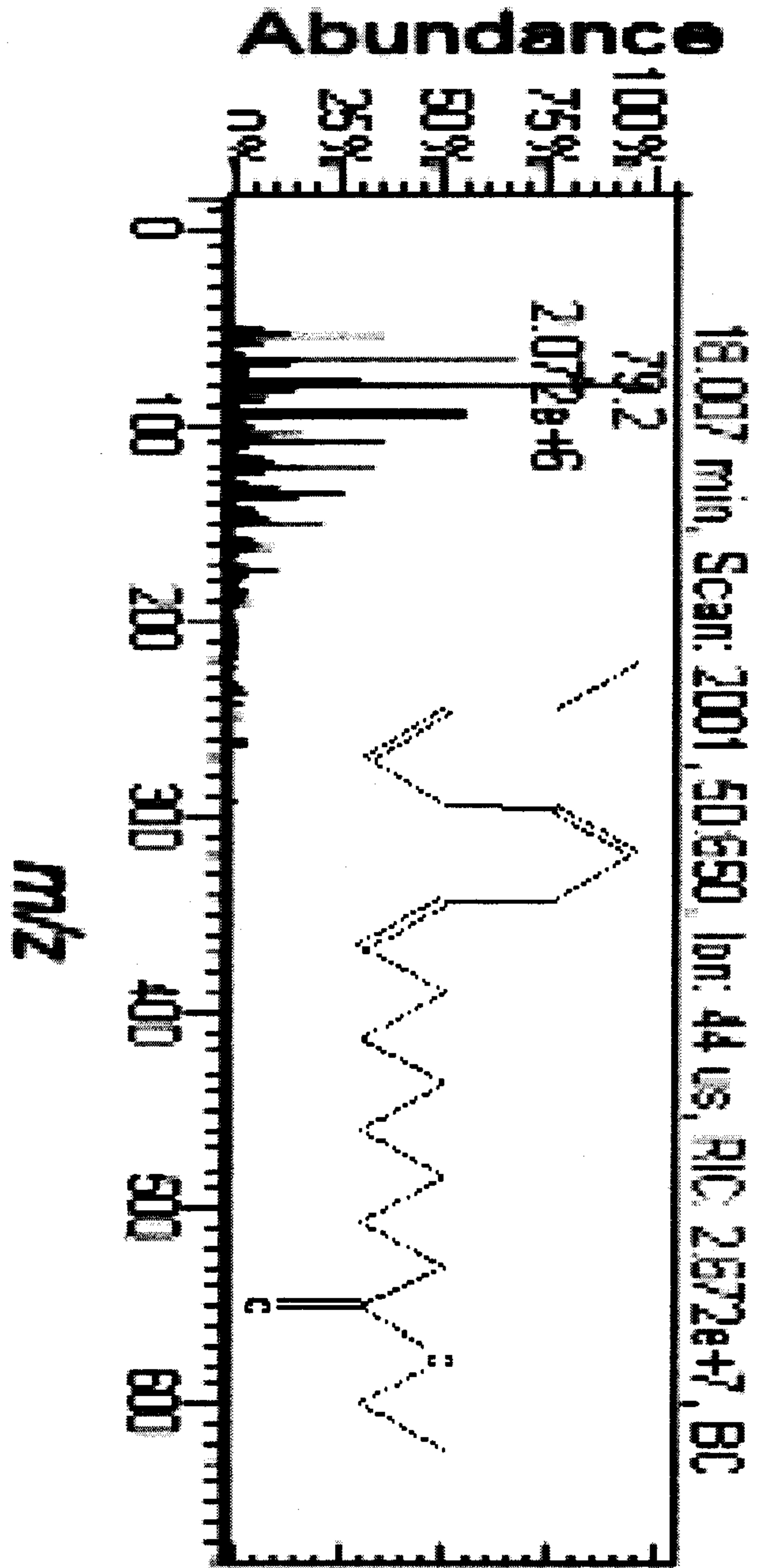


Figura 17

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

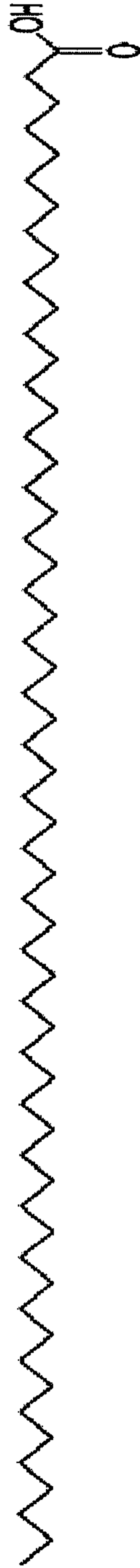


Figura 18

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



Rel. Abundance

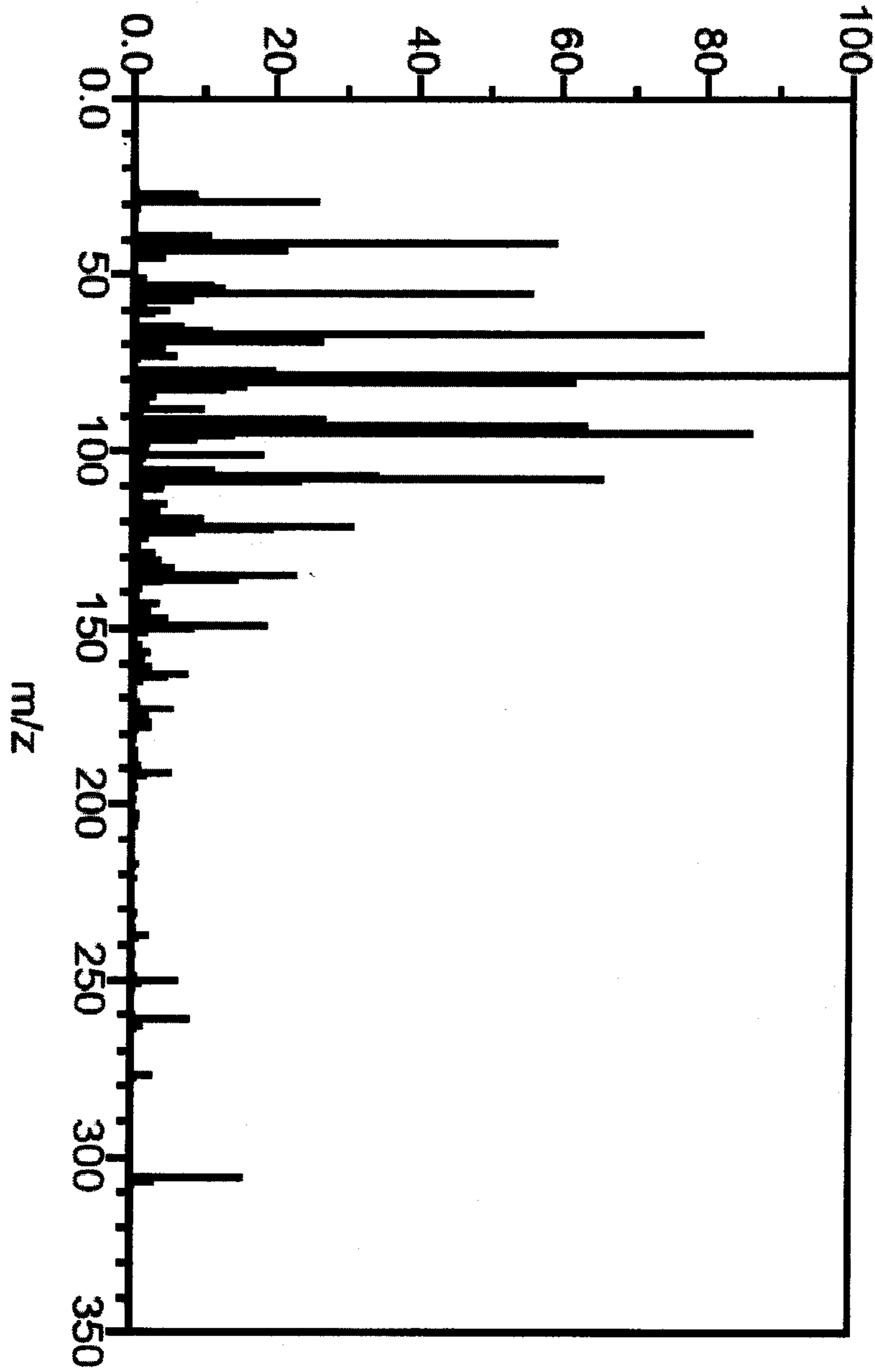


Figura 19

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

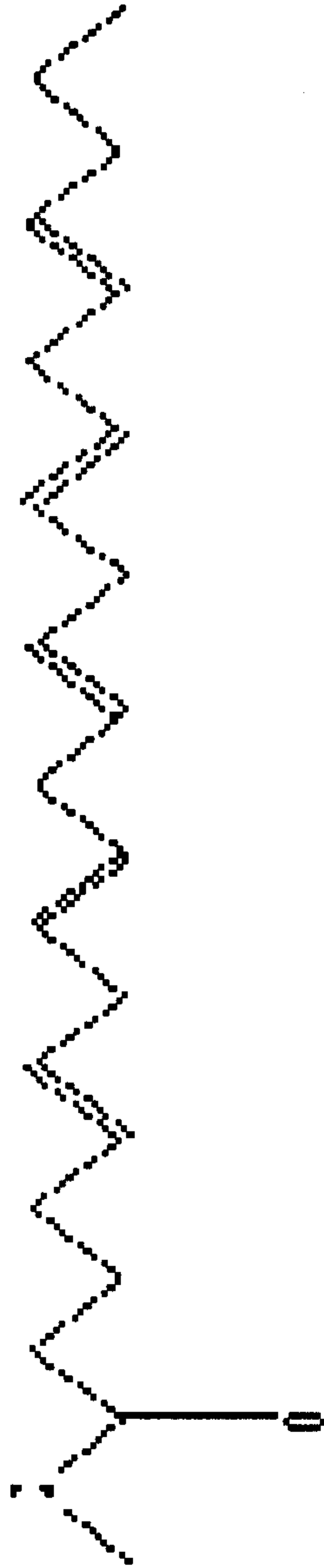


Figura 20

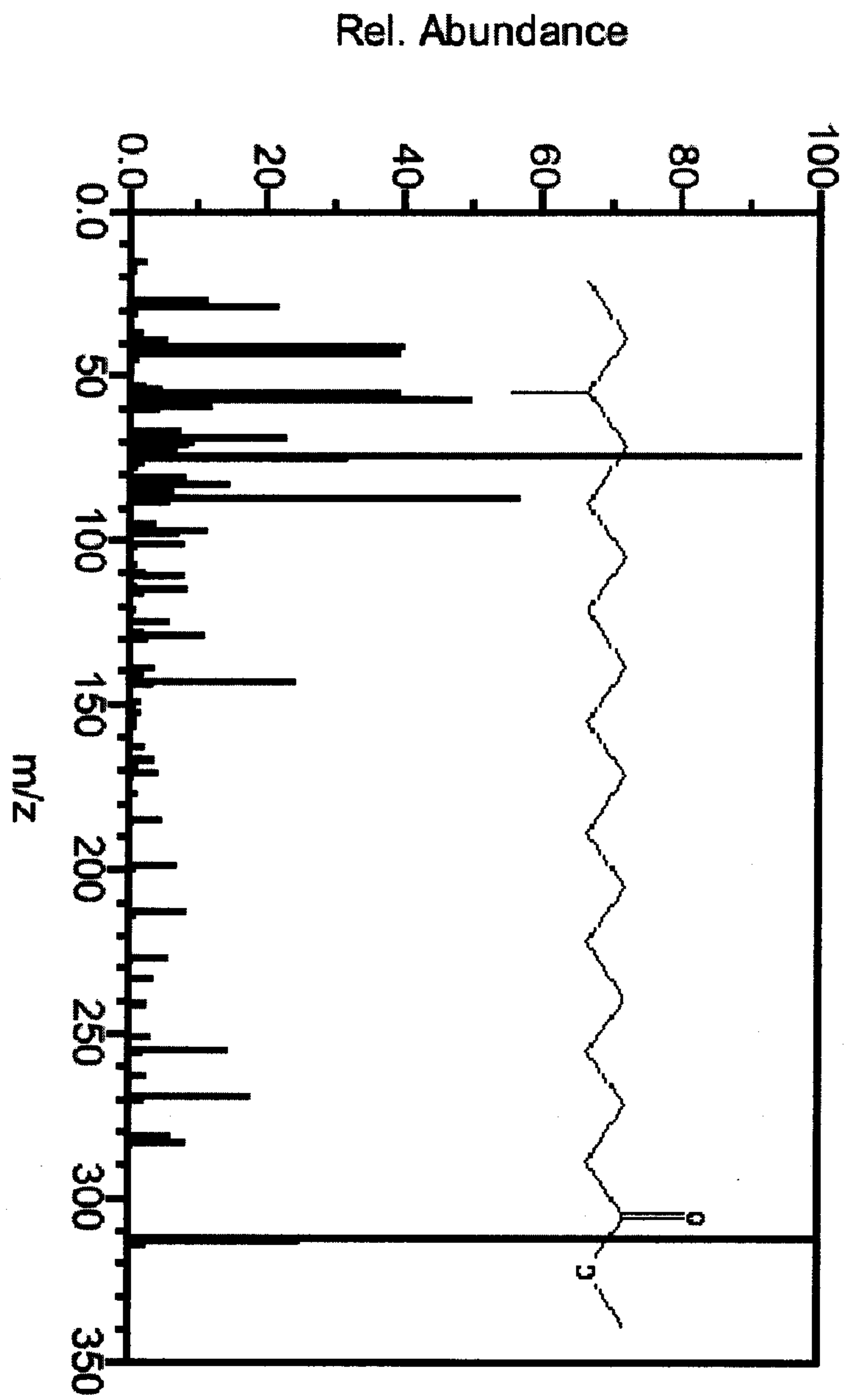


Figura 21

Haemonchus sp

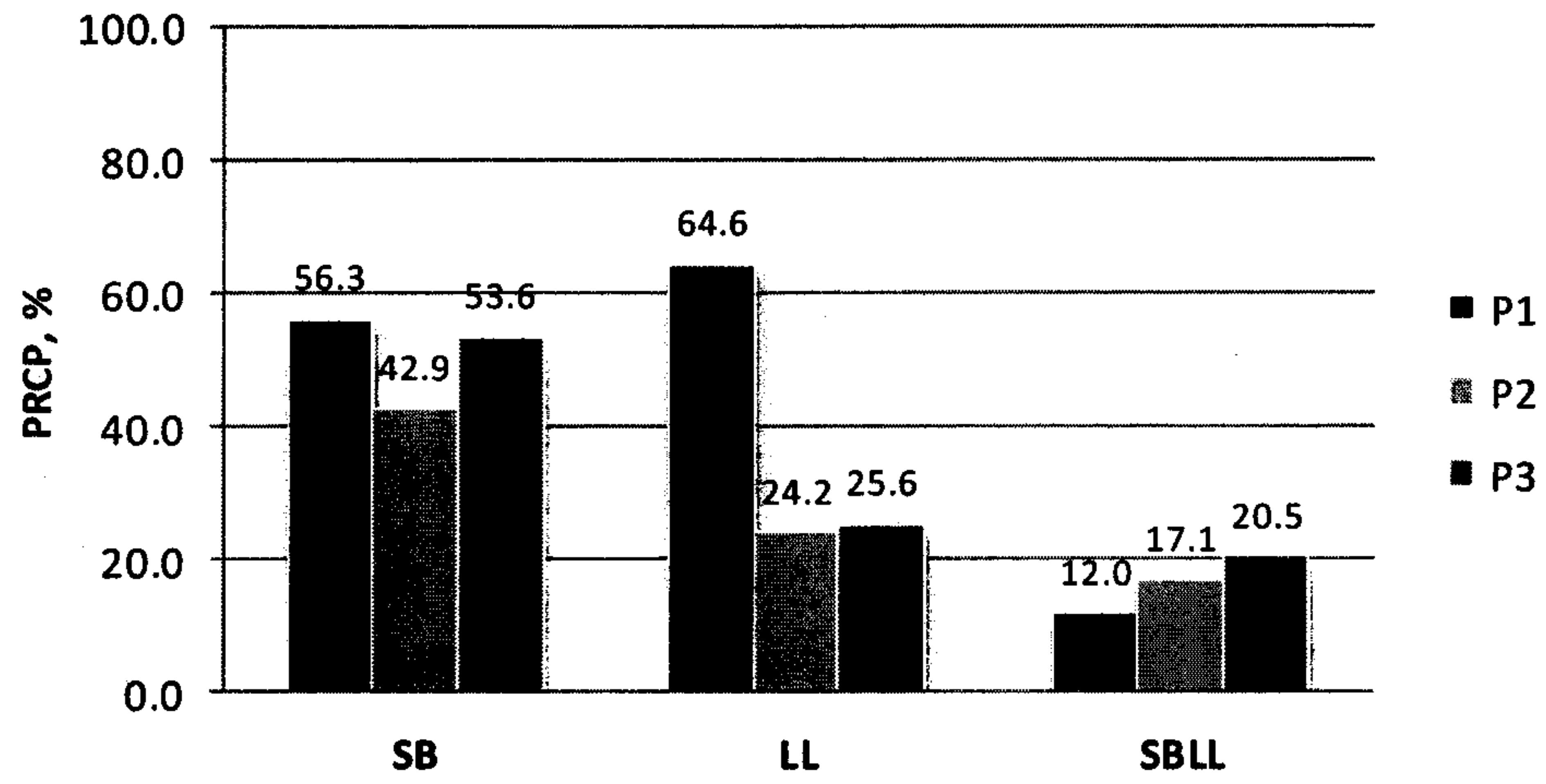




Figura 22

Ostertagia sp

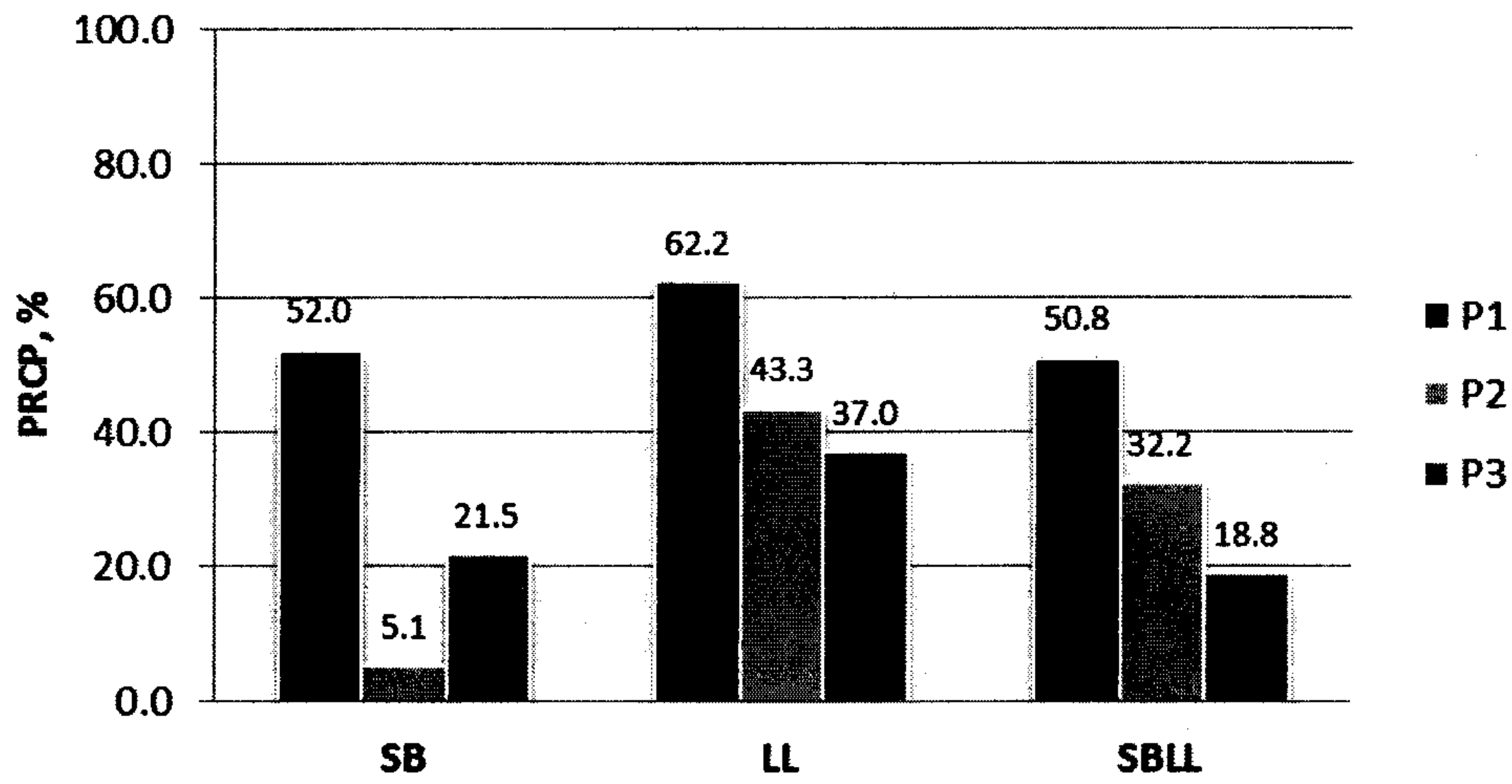


Figura 23



Oesophagostomum spp

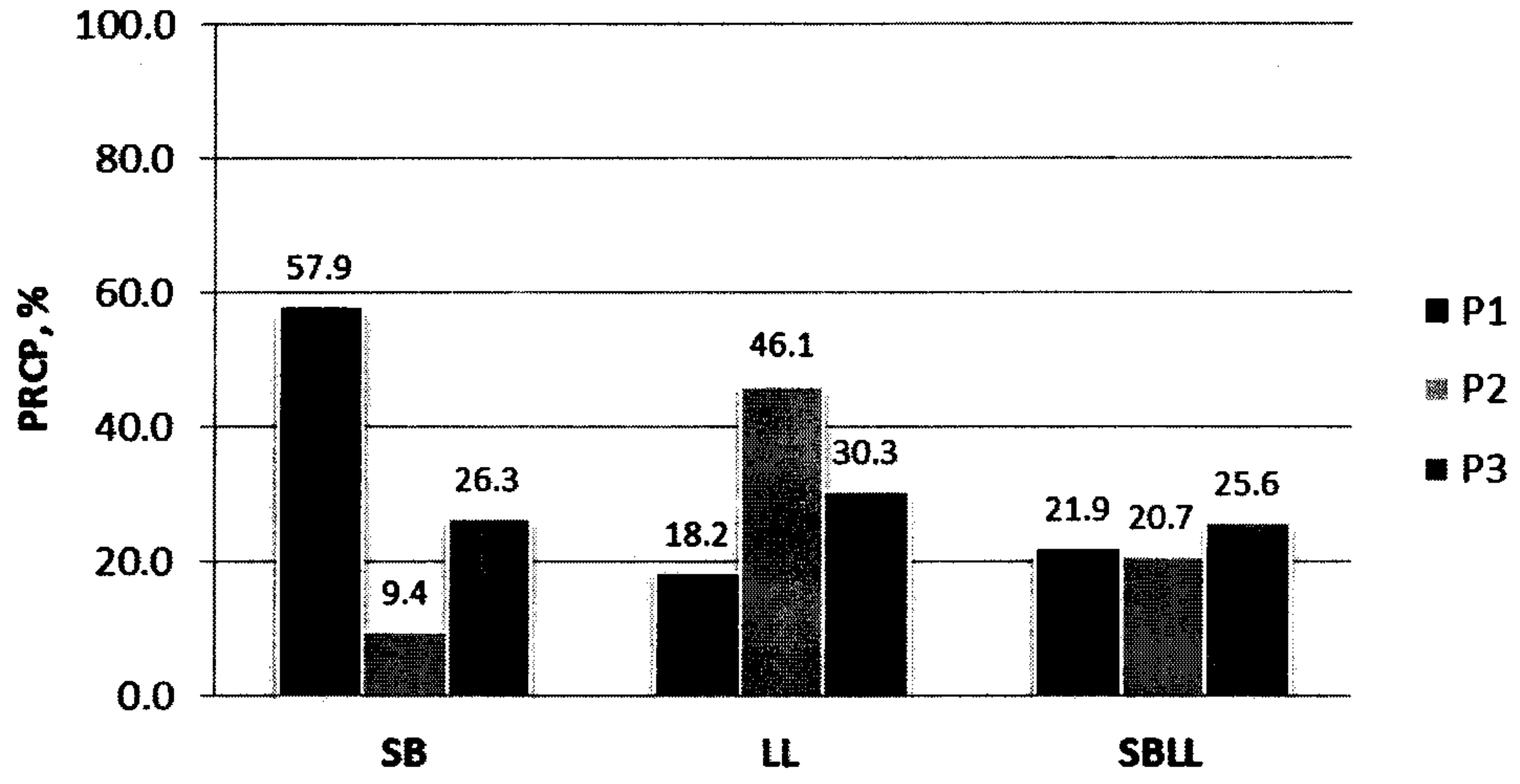


Figura 24



Cooperia sp

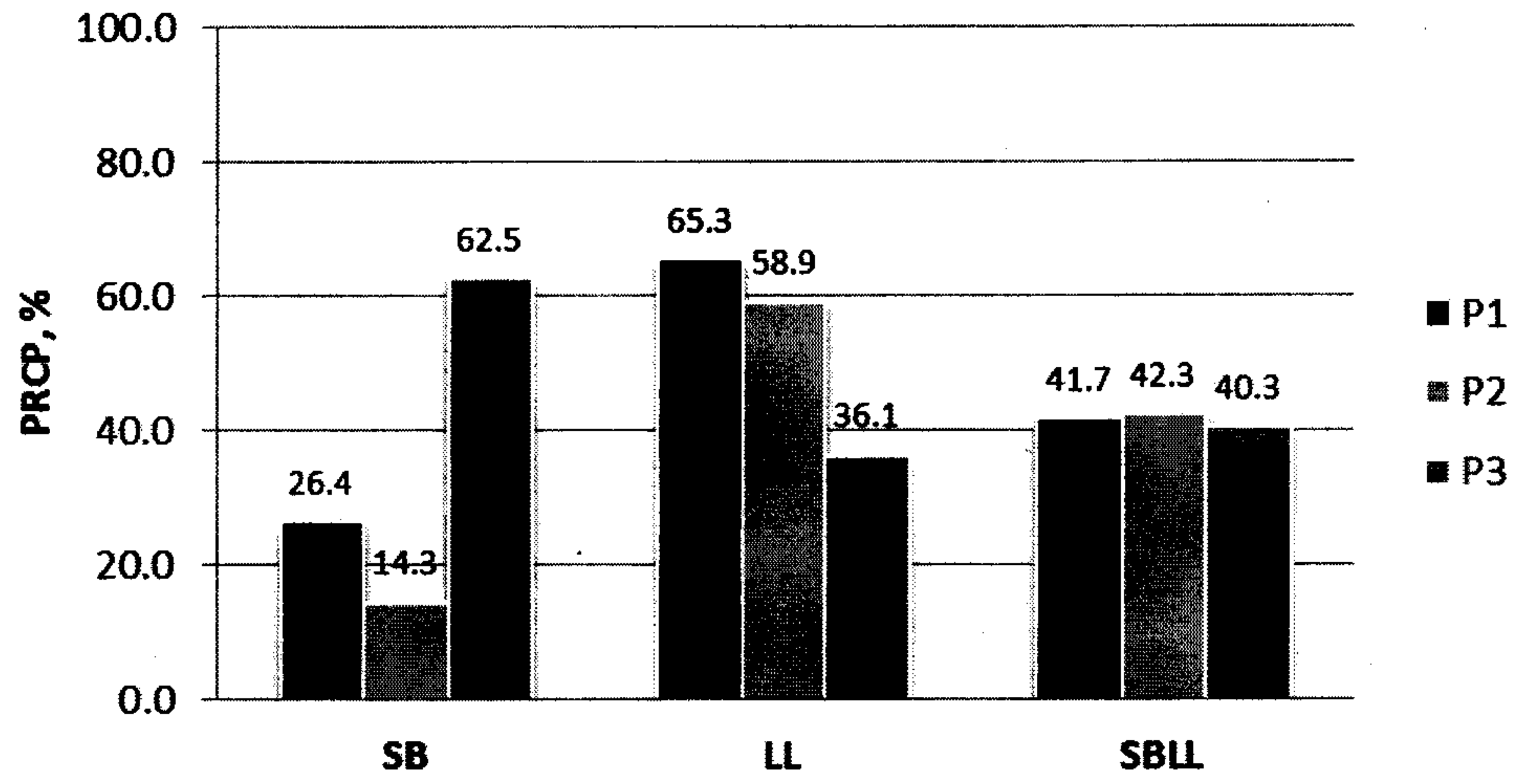


Figura 25



Bonostomum sp

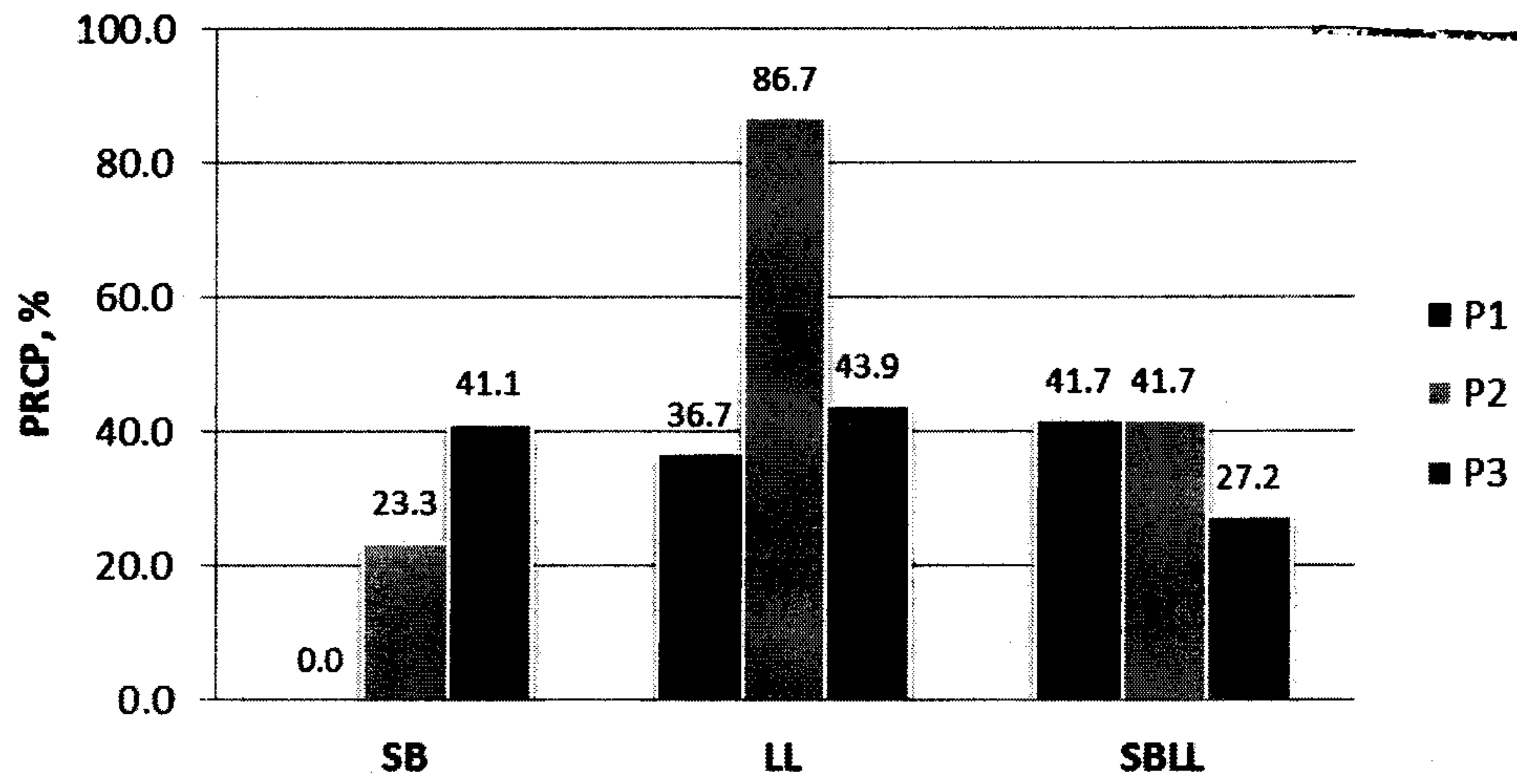


Figura 26

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



Nematodirus battus

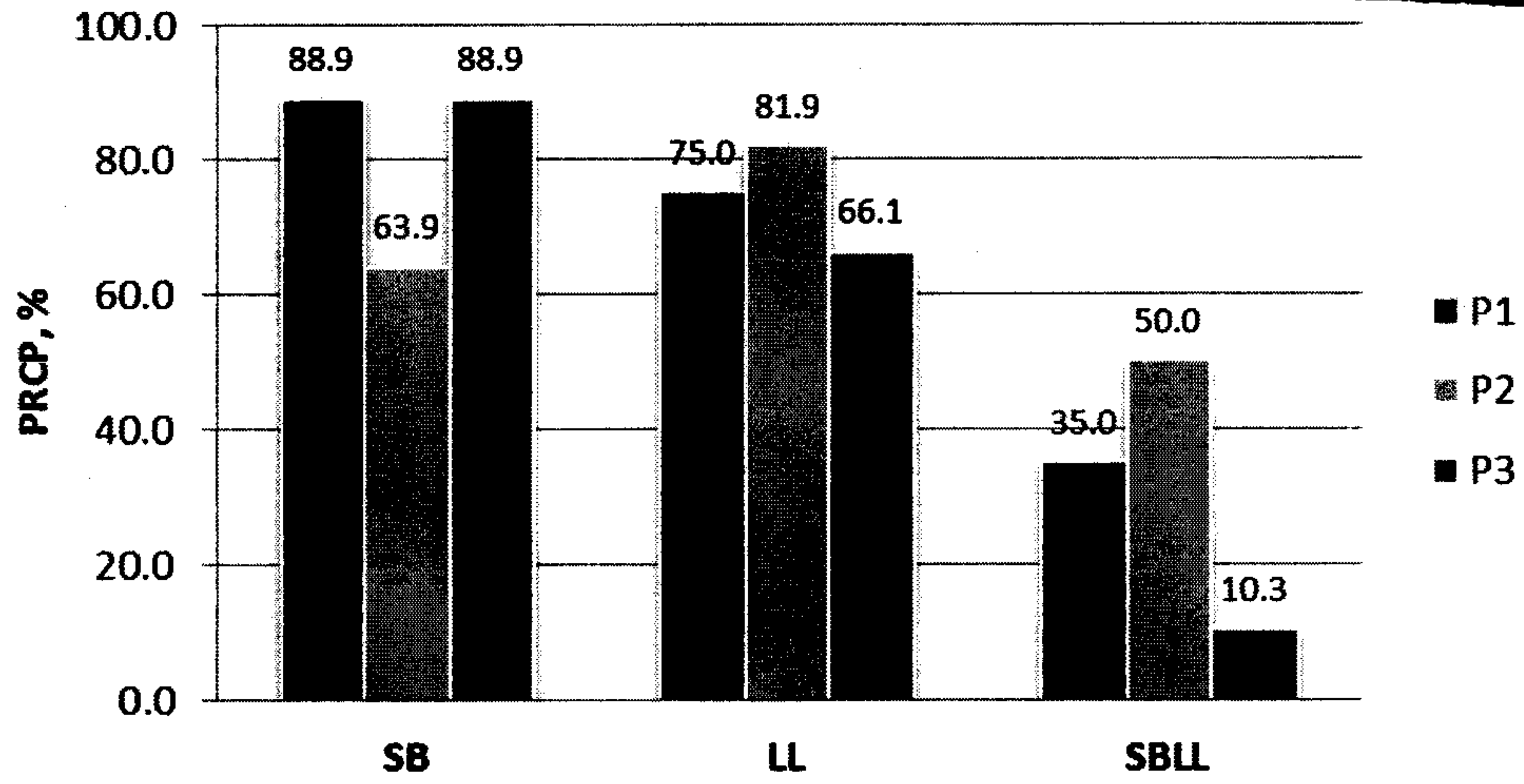


Figura 27



Chaberita sp

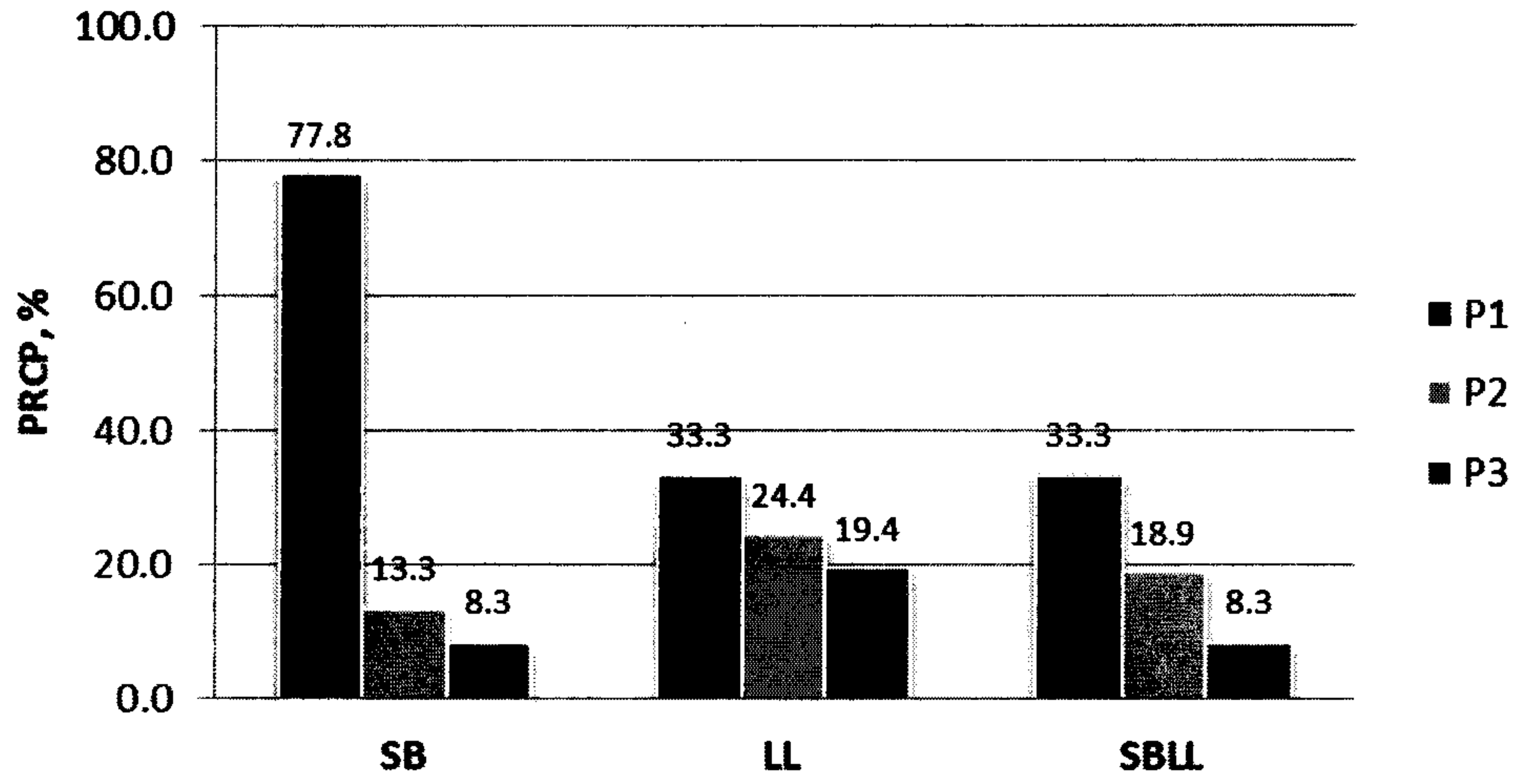


Figura 28



Strongiloides papillosus

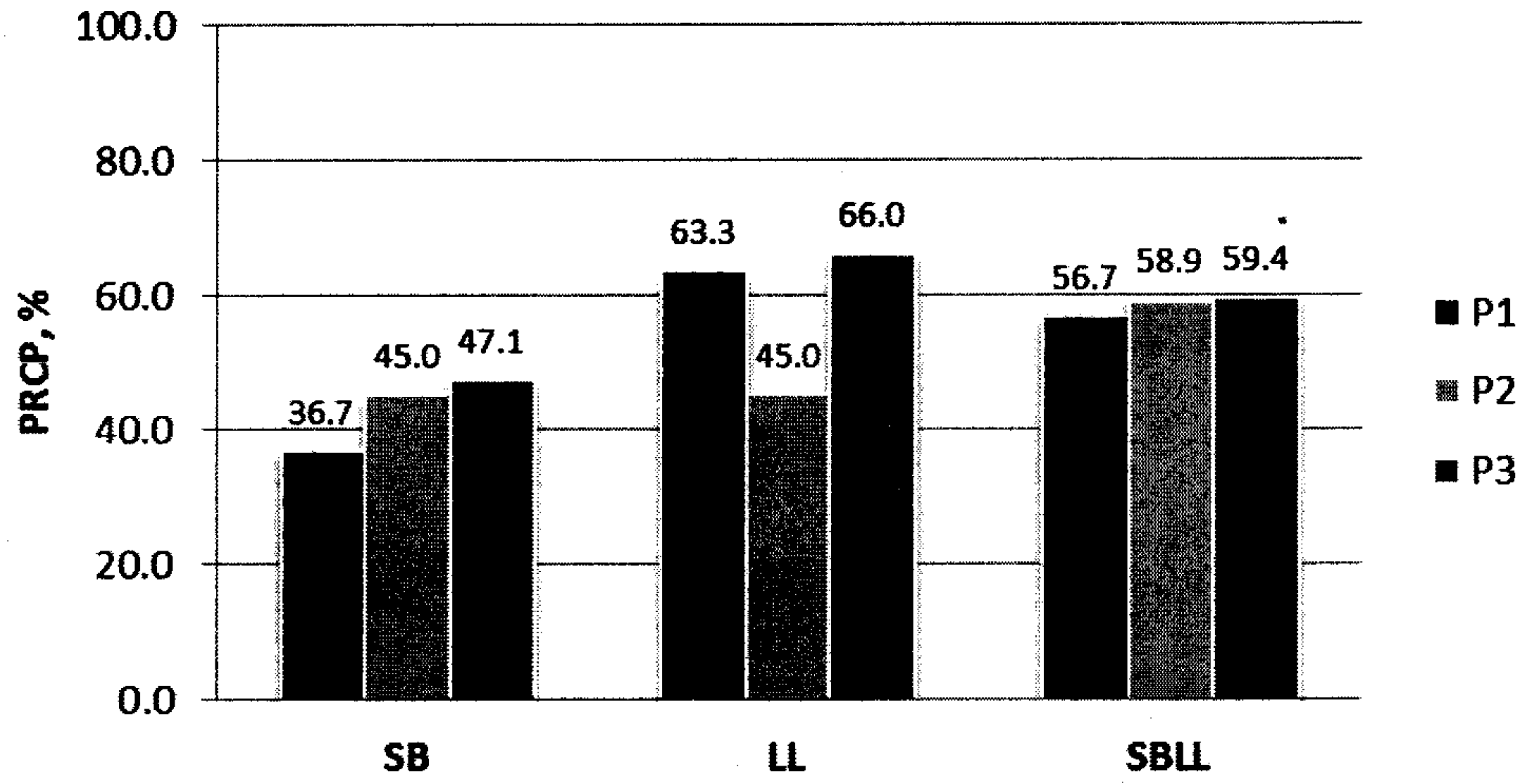


Figura 29



Nematodirus spathiger

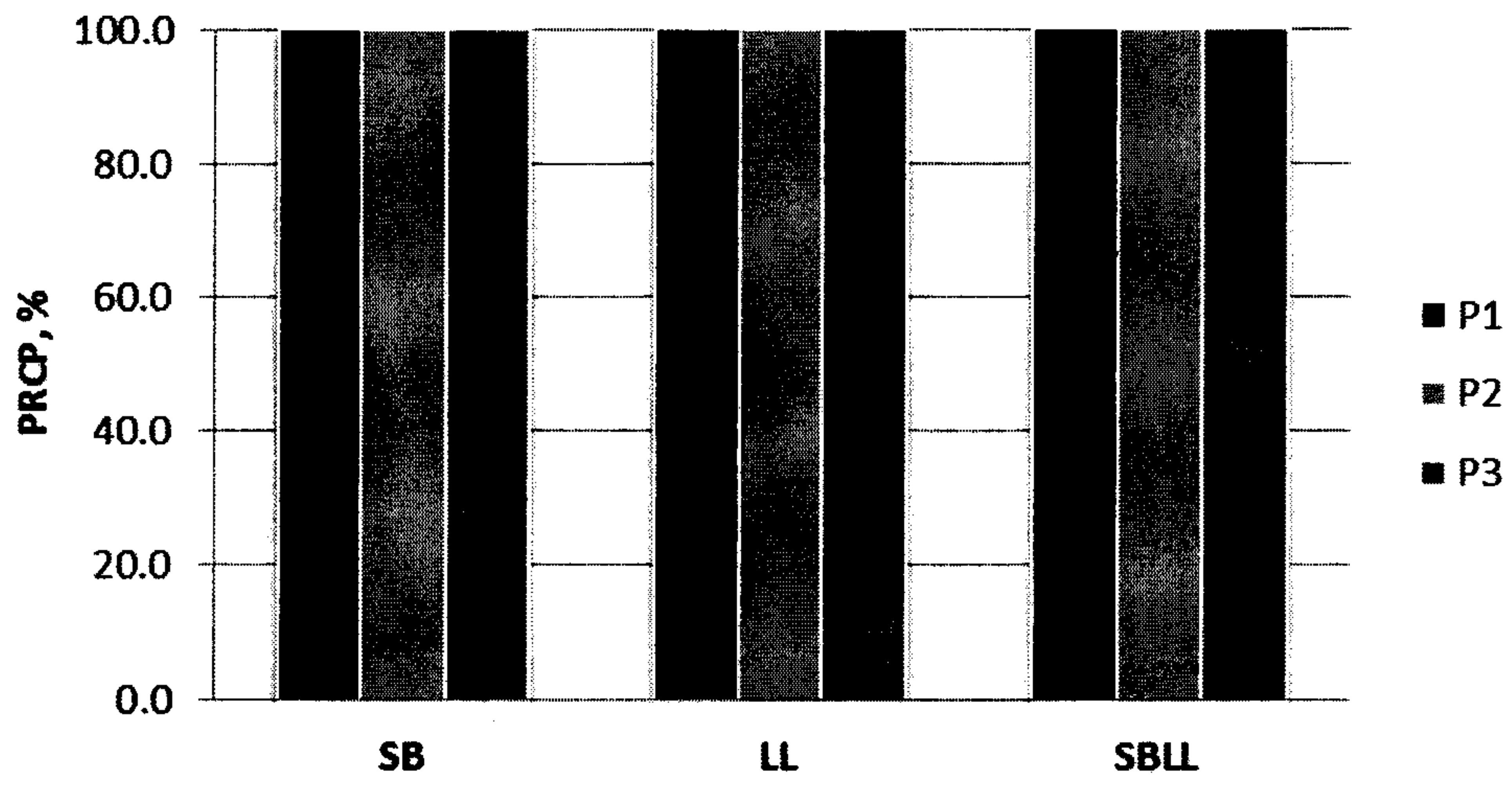


Figura 30

